

Université de Montréal

# **Implication des protéines WHIRLY dans la biogénèse du chloroplaste en association avec la protéine SIG6**

par

Sébastien Truche

Département de biochimie

Faculté de Médecine

Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures et postdoctorales  
en vue de l'obtention du grade de Maîtrise en Biochimie

Décembre 2012

© Sébastien Truche, 2012



Université de Montréal  
Faculté des études supérieures et postdoctorales

Ce mémoire intitulé :

**Implication des protéines WHIRLY dans la biogénèse du  
chloroplaste en association avec la protéine SIG6**

Présenté par :  
Sébastien Truche

A été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Dr. Sylvie Mader

.....

Président-Rapporteur

Dr. Normand Brisson

.....

Directeur de recherche

Dr. David Morse

.....

Membre du jury



## Résumé

Le mode vie autotrophique des plantes repose entièrement sur l'intégrité du chloroplaste et notamment l'étape de la biogénèse. La transcription des gènes chloroplastiques, assurée par une PEP (ARN polymérase encodée par le chloroplaste) et deux NEPs (ARN polymérase encodée par le noyau), est l'une des étapes primordiales dans le développement d'un chloroplaste photosynthétique. On distingue trois classes de gènes chloroplastiques : les gènes de classe I, transcrits par la PEP exclusivement; les gènes de classe II, transcrits par la PEP ou les NEPs; et les gènes de classe III, transcrits exclusivement par les NEPs. Pour assurer sa fonction, la PEP doit être associée à des facteurs sigmas. L'un de ceux-ci, la protéine SIG6, est un facteur sigma général et, associé à la PEP, assure la transcription de l'ensemble des gènes de classe I et II lors du développement du chloroplaste photosynthétique. Ainsi, le mutant *sig6* présente un phénotype de cotylédons pâles, associé à un retard de biogénèse chloroplastique, ainsi qu'une diminution de la transcription des gènes de classe I, provoquant la diminution de la quantité de protéines de classe I.

Dans le laboratoire, nous étudions les deux protéines WHIRLY chloroplastiques (WHY1 et WHY3) pour leur rôle dans le maintien de la stabilité génomique chloroplastique. Toutefois, peu de choses sont encore connues sur leur rôle potentiel dans la transcription ou la biogénèse chloroplastique. Par exemple, lorsque l'on tente de purifier la PEP, on obtient un gros complexe transcriptionnel nommé PTAC (Plastid Transcriptionally Active Chromosome) dans lequel sont retrouvées les deux protéines WHIRLY, suggérant qu'elles pourraient être impliquées dans la transcription chloroplastique. De plus, un possible rôle dans la biogénèse chloroplastique leur a été prêté, notamment chez le maïs. Dans cette étude, nous avons donc cherché à vérifier l'implication des protéines WHIRLY dans la biogénèse chloroplastique par une approche génétique de croisements entre les mutants *sig6* et *why1why3*.

Pour cela, nous avons isolé des doubles mutants *sig6why1* et *sig6why3*, ainsi qu'un triple mutant *sig6why1why3*. À l'aide d'une caractérisation phénotypique et de la

quantification de quelques protéines chloroplastiques, nous avons remarqué que la perte d'un des WHIRLY permet de compléter le phénotype de cotylédons pâles du mutant *sig6* et favorise l'expression normale de protéines en principe sous-exprimées dans le mutant *sig6*. Toutefois, la perte des deux WHIRLY ne permet pas de compenser le phénotype de cotylédons pâles et provoque l'apparition d'un phénotype persistant associé à une expression anormale des protéines chloroplastiques. Ces résultats ne peuvent être expliqués par le rôle des WHIRLY dans le maintien de la stabilité génomique chloroplastique étant donné que le triple mutant *sig6why1why3* présente moins de réarrangements que le double mutant *why1why3*. Finalement, nous montrons que les effets de la perte d'un WHIRLY sur le mutant *sig6* peuvent être mimés par l'utilisation de la rifampicine, une drogue inhibant l'ARN polymérase chloroplastique de type bactérienne (PEP).

Ensemble, ces résultats démontrent donc l'implication des protéines WHIRLY chloroplastiques dans la biogénèse chloroplastique en association avec la protéine SIG6. Nous proposons un modèle selon lequel les deux protéines WHIRLY permettraient de favoriser l'activité de l'ARN polymérase de type bactérienne, notamment lors du développement du chloroplaste photosynthétique. En cas d'absence d'une des deux protéines, cette diminution partielle d'activité de la PEP favoriserait la mise en place d'un mécanisme de complémentation par les NEPs, permettant finalement de rétablir la biogénèse chloroplastique dans un mutant *sig6*. En l'absence des deux WHIRLY, le mécanisme de complémentation par les NEPs serait incapable de compenser la forte inhibition de la PEP, se traduisant par une aggravation du retard de développement du chloroplaste dans le mutant *sig6*.

**Mots-clés :** SIG6, WHIRLY, chloroplaste, transcription, PEP, rifampicine, biogénèse chloroplastique

## **Abstract**

The autotrophic lifestyle of plants relies entirely on the integrity of chloroplasts and particularly on their biogenesis. Chloroplast gene transcription, performed by a Plastid-Encoded Polymerase (PEP) and two Nuclear-Encoded Polymerases (NEPs), is one of the key steps during the development of photosynthetic chloroplast. There are 3 classes of genes, one transcribed by PEP alone (class I), one by both PEP and NEPs (class II), and the third by NEPs alone (class III). To carry out transcription, PEP associates with plastid sigma factors including the general sigma factor SIG6. *sig6* mutants have a pale cotyledon phenotype, a severe decrease in class I gene transcription and a reduction in the level of class I proteins.

In our laboratory, we study the role of the two plastid WHIRLY proteins (WHY1 and WHY3) in maintaining plastid genome stability. However, little is known about any role these proteins may play in transcription or chloroplast biogenesis. It seems likely they are involved in plastid gene transcription since they are found in the Plastid Transcriptionally Active Chromosome (PTAC). Moreover, they have been implicated in chloroplast biogenesis in maize. In this study, we verified the implication of these proteins in plastid biogenesis using a genetic approach in which we crossed a *sig6* mutant with a *why1why3* mutant.

We isolated *sig6why1* and *sig6why3* double mutants and a *sig6why1why3* triple mutant. Using a phenotypic characterisation and quantification of some plastid proteins, we show that loss of one of the two *Why* genes complements the *sig6* pale cotyledon phenotype and allows a more normal pattern of expression of plastid proteins that are under-expressed in the *sig6* mutant. However, we also show that loss of the two *Why* genes does not alleviate the *sig6* phenotype. Moreover, the triple mutant shows a second pale phenotype on true leaves, and the plastid protein expression pattern is abnormal compared to either *sig6* or wild type plants. Those results cannot be explained by the role of WHIRLY proteins in plastid genome stability since the triple mutant shows fewer plastid genome rearrangements than the *why1why3* mutant. Finally, we show that inhibition of

the PEP polymerase using rifampicin elicits the same complementation of the *sig6* phenotype as the loss of one of the two WHIRLY.

Together, these results show the implication of WHIRLY proteins in plastid biogenesis in association with SIG6. We propose a model in which WHIRLY act as activators of PEP activity, particularly during the chloroplast biogenesis. Therefore, the absence of one of the WHIRLY would cause a weak inhibition of PEP, facilitating the set-up of a rescue mechanism by NEPs and, consequently, allowing the complementation of plastid biogenesis in the *sig6* mutant. However, the absence of the two WHIRLY proteins would cause a strong inhibition of PEP, and the inability of the rescue mechanism by NEPs to compensate for this strong inhibition, resulting in a more severe phenotype in the *sig6* mutant.

**Keywords :** SIG6, WHIRLY, chloroplast, transcription, PEP, plastid biogenesis, rifampicin



# Table des matières

RÉSUMÉ .....	III
ABSTRACT .....	V
TABLE DES MATIÈRES .....	VII
LISTE DES TABLEAUX .....	X
LISTE DES FIGURES .....	XI
LISTE DES ABRÉVIATIONS .....	XIII
REMERCIEMENTS .....	XV
<b>1. INTRODUCTION .....</b>	<b>1</b>
1.1. INTRODUCTION .....	2
1.2. LE CHLOROPLASTE .....	2
1.2.1. <i>Le chloroplaste des plantes</i> .....	2
1.2.2. <i>La biogénèse du chloroplaste</i> .....	4
1.3. LA SIGNALISATION RÉTROGRADE DU CHLOROPLASTE AU NOYAU .....	6
1.4. LA TRANSCRIPTION DANS LE CHLOROPLASTE .....	10
1.4.1. <i>Les ARN polymérases chloroplastiques</i> .....	10
1.4.2. <i>Les promoteurs chloroplastiques</i> .....	12
1.4.3. <i>Les facteurs associés à la PEP</i> .....	14
1.5. LE FACTEUR SIGMA SIG6 .....	19
1.5.1. <i>Structure et fonction de SIG6</i> .....	19
1.5.2. <i>Régulation de l'activité de SIG6</i> .....	23
1.6. LES PROTÉINES WHIRLY CHLOROPLASTIQUES .....	26
1.6.1. <i>Structure des protéines WHIRLY chloroplastiques</i> .....	26
1.6.2. <i>Rôle dans le maintien de la stabilité génomique chloroplastique</i> .....	26
1.6.3. <i>Autres rôles des protéines WHIRLY chloroplastiques</i> .....	27
1.7. PROJET DE RECHERCHE .....	29
<b>2. MATÉRIEL ET MÉTHODES .....</b>	<b>31</b>
2.1. LIGNÉES MUTANTES UTILISÉES .....	32

2.2.	CONDITIONS DE CULTURE DES PLANTES .....	32
2.3.	CROISEMENTS, GÉNOTYPAGE ET IDENTIFICATION DE L'INSERTION T-DNA DANS LE MUTANT <i>SIG6</i> .....	32
2.4.	MICROSCOPIE CONFOCALE .....	33
2.5.	QUANTIFICATION DE LA CHLOROPHYLLE A ET B .....	33
2.6.	EXTRACTION DES ACIDES NUCLÉIQUES.....	34
2.7.	EXTRACTION DES PROTÉINES TOTALES DES PLANTES ET IMMUNO-BUWARDAGE DE TYPE WESTERN .....	34
2.8.	RT-PCR SEMI-QUANTITATIVE .....	35
2.9.	DÉTECTION DES RÉARRANGEMENTS DANS LE GÉNOME CHLOROPLASTIQUE .....	36
2.10.	CONSTRUCTIONS DES PLASMIDES POUR LE DOUBLE-HYBRIDE .....	37
2.11.	EXPÉRIENCE DE DOUBLE-HYBRIDE EN LEVURE .....	38
2.12.	EXTRACTION DE PROTÉINES TOTALES DES LEVURES ET IMMUNO-BUWARDAGE DE TYPE WESTERN .....	39
3.	RÉSULTATS.....	42
3.1.	CARACTÉRISATION D'UNE NOUVELLE LIGNÉE SIG6 MUTANTE POUR LE FACTEUR SIGMA 6. ....	43
3.2.	CROISEMENT DU MUTANT <i>WHY1WHY3</i> AVEC LE MUTANT <i>SIG6</i> . ....	46
3.3.	L'ABSENCE D'UN DES DEUX WHIRLY COMPLÈTE L'APPARITION DU PHÉNOTYPE DU MUTANT <i>SIG6</i> . ....	49
3.5.	L'EXPRESSION DE PROTÉINES CHLOROPLASTIQUES IMPLIQUÉES DANS LA PHOTOSYNTÈSE EST RÉTABLIE FORTEMENT DANS LES DOUBLES MUTANTS ET MOINDREMENT CHEZ LE TRIPLE MUTANT À 4 JOURS. ....	55
3.6.	L'EXPRESSION DE GÈNES NUCLÉAIRES IMPLIQUÉS DANS LA PHOTOSYNTÈSE EST ÉGALEMENT RÉTABLIE À 4 JOURS CHEZ LES DOUBLES MUTANTS.....	59
3.7.	L'EXPRESSION DES PROTÉINES CHLOROPLASTIQUES EST ANORMALE APRÈS 10 JOURS DE DÉVELOPPEMENT CHEZ LE TRIPLE MUTANT. ....	61
3.8.	LE TRIPLE MUTANT <i>SIG6WHY1WHY3</i> PRÉSENTE MOINS DE RÉARRANGEMENTS QUE LE DOUBLE MUTANT <i>WHY1WHY3</i> .....	64
3.9.	UN TRAITEMENT À FAIBLE DOSE DE RIFAMPICINE EST CAPABLE DE COMPLÉMENTER ÉGALEMENT LE PHÉNOTYPE DU MUTANT <i>SIG6</i> .....	67
3.10.	UN TRAITEMENT À FAIBLE DOSE DE RIFAMPICINE PROVOQUE L'APPARITION DU PHÉNOTYPE TARDIF CHEZ LES DOUBLES MUTANTS <i>SIG6WHY3</i> ET <i>SIG6WHY1</i> À 12 JOURS. ....	71
3.11.	LA PROTÉINE <i>SIG6</i> N'INTERAGIT PAS DIRECTEMENT AVEC LES PROTÉINES <i>WHY1</i> OU <i>WHY3</i> . ....	73
4.	DISCUSSION .....	77
4.1.	LE MUTANT <i>SIG6-3</i> PRÉSENTE UN RETARD DE CROISSANCE ASSOCIÉ À UN DÉFAUT D'EXPRESSION DES PROTÉINES CHLOROPLASTIQUES.....	78
4.2.	LA PERTE D'UNE SEULE DES DEUX PROTÉINES WHIRLY EST BÉNÉFIQUE AU MUTANT <i>SIG6</i> .....	80
4.3.	LA PERTE DES DEUX PROTÉINES WHIRLY A UN EFFET DÉLÉTÈRE SUR LE MUTANT <i>SIG6</i> .....	83

4.4.	LES PROTÉINES <b>WHIRLY</b> SONT IMPLIQUÉES DANS LA BIOGÉNÈSE CHLOROPLASTIQUE .....	85
4.5.	LE RÔLE DANS LE MAINTIEN DE LA STABILITÉ GÉNOMIQUE DES PROTÉINES <b>WHIRLY</b> NE SEMBLE PAS ÊTRE À L'ORIGINE DE LEUR RÔLE DANS LA BIOGÉNÈSE CHLOROPLASTIQUE.....	86
4.6.	UNE INTERACTION DIRECTE ENTRE LES PROTÉINES <b>WHIRLY</b> ET <b>SIG6</b> N'EXPLIQUE PAS LE RÔLE DES PROTÉINES <b>WHIRLY</b> DANS LA BIOGÉNÈSE CHLOROPLASTIQUE .....	88
4.7.	UNE LÉGÈRE INHIBITION DE LA <b>PEP</b> PROVOQUE LA COMPLÉMENTATION DU MUTANT <b>SIG6</b> .....	89
4.8.	LES PROTÉINES <b>WHIRLY</b> POURRAIENT ÊTRE IMPORTANTES POUR LE MAINTIEN DE L'ACTIVITÉ DE LA <b>PEP</b> .....	90
4.9.	CONCLUSION ET PERSPECTIVES .....	95
5.	BIBLIOGRAPHIE .....	98

## **Liste des tableaux**

<b>Tableau I : Liste des amorces utilisées dans l'étude .....</b>	<b>40</b>
---	-----------

## Liste des figures

Figure 1 : Les sept étapes essentielles à la biogénèse des chloroplastes. ....	6
Figure 2: Représentation schématique des facteurs sigma 1-6 chloroplastiques chez <i>Arabidopsis thaliana</i> et des facteurs de type $\sigma^{70}$ bactérien. ....	17
Figure 3: Modèle schématisant l'activité relative de la protéine SIG6 en fonction du temps comparativement aux autres facteurs sigma ou aux NEPs .....	21
Figure 4 : Stratégie de PCR utilisée pour détecter les réarrangements dans le génome chloroplastique.....	37
Figure 5 : Caractérisation d'une nouvelle lignée <i>sig6</i> mutante pour le facteur sigma 6 .....	45
Figure 6 : Croisement du mutant <i>sig6</i> avec une lignée <i>why1why3</i> .....	48
Figure 7 : Les mutations <i>why1</i> ou <i>why3</i> complètent fortement le phénotype du mutant <i>sig6</i> .....	50
Figure 8 : La double mutation <i>why1why3</i> complémente faiblement le phénotype du mutant <i>sig6</i> .....	52
Figure 9 : Les mutants <i>sig6why1why3</i> présentent un phénotype tardif et persistant .....	54
Figure 10 : L'expression des protéines chloroplastiques est rétablie dans les doubles mutants à 4 jours.....	58

Figure 11 : L'expression des gènes nucléaires associés à la photosynthèse est rétablie dans les doubles-mutants à 4 jours.....	60
Figure 12 : L'expression des protéines chloroplastiques est anormale chez le triple mutant à 10 jours. ....	63
Figure 13 : Le triple mutant <i>sig6why1why3</i> accumule moins de réarrangements que le double mutant <i>why1why3</i> .....	66
Figure 14 : Un traitement à faible dose de rifampicine est capable de compléter le phénotype du mutant <i>sig6</i> .....	70
Figure 15 : Un traitement à faible dose de rifampicine provoque l'apparition du phénotype persistant chez les doubles mutants .....	72
Figure 16 : Absence d'interaction protéique directe entre les protéines SIG6 et WHIRLY (WHY1 ou WHY3). ....	76
Figure 17 : Modèle décrivant l'activité de la PEP et des NEPs dans les différents mutants et l'impact sur la transcription des gènes de classe I et II. ....	94

## **Liste des abréviations**

<b>ADN</b>	Acide DésoxyriboNucléique
<b>ADNc</b>	ADN complémentaire
<b>ARN</b>	Acide RiboNucléique
<b>ATPB</b>	ATP synthase Beta subunit – Sous-unité $\beta$ de l'ATP synthase, enzyme impliquée dans la synthèse d'ATP lors de la phosphorylation oxydative dans le chloroplaste (encodée par le génome chloroplastique)
<b>Col-0</b>	Columbia-0 – Écotype sauvage d' <i>Arabidopsis thaliana</i>
<b>DCAPS</b>	Derived Cleaved Amplified Polymorphic Sequence – Méthode de PCR suivi d'un clivage du produit, permettant de différencier deux produits ayant un unique nucléotide de différence
<b>LHCB</b>	Light Harvesting Complex chlorophyll a/b Binding – Famille de protéines encodées par le génome nucléaire et permettant de fixer la chlorophylle a et b dans les antennes des Photosystèmes I et II.
<b>MMBIR</b>	Microhomology-Mediated Break-Induced Repair – Réparation suivant un bris par l'intermédiaire de micro-homologies
<b>NEP</b>	Nuclear-Encoded Polymerase – ARN polymérase encodée par le génome nucléaire
<b>pb</b>	paires de bases
<b>PCR</b>	Polymerase Chain Reaction – Réaction en chaîne par polymérisation
<b>PEP</b>	Plastid-Encoded Polymerase – ARN Polymérase exprimée par le génome plastidique
<b>PhANGs</b>	Photosynthesis Associated Nuclear Genes – Gènes nucléaires encodant des protéines impliquées dans la photosynthèse
<b>PSAA</b>	Protéine constituant le centre réactionnel du Photosystème I (encodée par le génome chloroplastique)
<b>PSBA</b>	Protéine D1 de liaison de la chlorophylle au cœur du centre réactionnel du

	Photosystème II (encodée par le génome chloroplastique)
<b>PTAC</b>	Plastid Transcriptionally Active Chromosome – Fractions de protéines chloroplastiques purifiées ayant une activité polymérase et purifiée
<b>RBCL</b>	Ribulose-1,5-Biphosphate Carboxylase Large subunit – Grosse sous-unité de la ribulose carboxylase/oxygénase permettant de fixer le carbone lors de la photosynthèse (encodée par le génome chloroplastique)
<b>RBCS</b>	Ribulose-1,5-Biphosphate Carboxylase Small subunit – Petite sous-unité de la ribulose carboxylase/oxygénase (encodée par le génome nucléaire)
<b>Rif</b>	Rifampicine – Drogue inhibant l'ARN polymérase de type bactérienne (PEP)
<b>ROS</b>	Reactive Oxygen Species – Espèces réactives oxygénées
<b>RPM</b>	Rotation par minute
<b>rpo</b>	RNA polymerase – Gènes codant pour les sous-unités A, B, C1 et C2 de l'ARN polymérase PEP
<b>RpoTmp</b>	RNA polymerase Targeted to mitochondria and plastid – ARN polymérase encodée dans le noyau puis ciblée aux mitochondries et aux chloroplastes
<b>RpoTp</b>	RNA polymerase Targeted to plastid – ARN polymérase encodée dans le noyau puis ciblée aux chloroplastes
<b>RT-PCR</b>	Reverse Transcriptase Polymerisation Chain Reaction – Transcription inverse suivi d'une réaction en chaîne par polymérisation
<b>SDS-PAGE</b>	Sodium Dodecyl Sulfate PolyAcrylamide Gel Electrophoresis – Électrophorèse en gel de polyacrylamide contenant du laurylsulfate de sodium
<b>SIG1-6</b>	SIGMA FACTOR 1-6 – Facteur sigma 1 à 6
<b>T-DNA</b>	Transfer DNA – ADN de transfert
<b>WHY1/WHY3</b>	WHIRLY 1/WHIRLY 3 – Les deux protéines de la famille Whirly ciblées aux chloroplastes



## **Remerciements**

Je tiens à remercier Normand Brisson, mon directeur de recherche, pour toute l'aide qu'il a pu m'apporter tout au long ma Maîtrise. Merci d'abord de m'avoir accueilli dans votre laboratoire. Merci également pour votre sincérité et votre bonne humeur. Il était très agréable de travailler avec vous.

La deuxième personne que je tiens à remercier est ma conjointe, Laurence. Merci de m'avoir écouté et supporté durant ces deux dernières années. Sans toi, je n'aurais sûrement pas été jusqu'au bout. Tu m'encourages toujours à me surpasser et à aller jusqu'au bout de ce que j'entreprends. Je t'aime!

Je tiens également à remercier quatre personnes du département pour leur sincérité. Avant tout Ginette, rayon d'humanité qui illumine les couloirs du département... Tu es merveilleuse Ginette! Ensuite, un merci à Sylvie Beauchemin, dont le sourire et la réelle implication permet de se retrouver dans les méandres labyrinthiques de l'administration... Ton professionnalisme est un exemple pour nous tous. Également, Éric Bonneau dont la seule présence suffit à vous libérez l'esprit de vos soucis et dont les visites au laboratoire étaient un pur moment de plaisir et de franche rigolade... Finalement, un merci à Philippe Lampron, que je n'ai réellement connu que trop tard malheureusement. Vous m'avez, tous les quatre, permis de passer de très bons moments durant la Maitrise. Merci encore!

Je voudrais également remercier les gars du laboratoire. Même si la vie entre 4 gars peut ne pas être toujours facile, les bons moments passés en votre compagnie ont contribué à rendre cette Maîtrise agréable.



# Introduction

## **1.1. Introduction**

Le mode de vie autotrophique des plantes repose entièrement sur l'intégrité du chloroplaste et sur sa capacité à effectuer la photosynthèse, en transformant le carbone inorganique en carbone organique. Toutefois, le passage d'un plaste vers un chloroplaste, capable d'effectuer efficacement la photosynthèse, peut être parfois compromis par certains facteurs environnementaux, tels que l'ensoleillement, la température ou la présence de nutriments, ou bien intrinsèques, tels que des facteurs génétiques.

Le plaste, en tant qu'organelle semi-autonome possédant son propre génome, doit donc effectuer, en concertation avec le noyau, différents processus lui permettant de mettre en place les structures indispensables à la photosynthèse. Ces étapes vont de la division à la régulation de l'efficacité photosynthétique, en passant par la transcription et la traduction de ses gènes.

## **1.2. Le chloroplaste**

### **1.2.1. Le chloroplaste des plantes**

#### **a- Origine, diversité et fonctions.**

Dans les cellules végétales, il existe deux types d'organelles : les mitochondries, également présentes chez les cellules eucaryotes animales, et les plastes, uniquement présents chez les cellules eucaryotes végétales. Les plastes, tout comme les mitochondries, sont originaires d'une endosymbiose. Une cellule ancestrale eucaryote, abritant déjà des mitochondries, aurait phagocyté une cyanobactérie ancestrale il y a environ 1.5 milliards d'années (Dyall et al., 2004). Celle-ci aurait ensuite évolué jusqu'à, de nos jours, devenir un plaste. Cette hypothèse fut avancée pour la première fois par Mereschowsky en 1905 (Traduction anglaise dans (Martin and Kowallik, 1999)).

Il existe plus d'une douzaine de variétés de plastes dans la plante. Ainsi, on distingue les proplastides, précurseurs de tous les autres types et présents dans les cellules

méristématiques, des chloroplastes, lieu de la photosynthèse, ou encore des étioplastes, chloroplastes non différenciés en l'absence de lumière (Wise, 2006). Cette diversité reflète les diverses fonctions des plastes, allant du stockage de l'amidon à la coloration des fruits, en passant par le gravitropisme (Wise, 2006; Inaba and Ito-Inaba, 2010).

Le type de plaste le plus connu est sans doute le chloroplaste. Sa fonction principale et majoritairement connue est la photosynthèse. Ainsi, en effectuant cette réaction photo-chimique, les chloroplastes permettent de maintenir le mode de vie autotrophe des plantes. Néanmoins, l'importance des chloroplastes ne se limite pas à cette fonction photosynthétique, du moins pour les plantes vasculaires. En effet, une étude a montré que sur 323 gènes dont la mutation mène à une mort embryonnaire chez la plante modèle *Arabidopsis thaliana*, 108 d'entre eux encodent des protéines chloroplastiques (Hsu et al., 2010). Cela souligne donc l'importance que peuvent avoir les chloroplastes pour le développement de la plante, et notamment dans l'embryogénèse.

#### **b- Le génome chloroplastique**

Le chloroplaste étant originaire d'une cyanobactérie ancestrale, il possède son propre génome. Celui-ci contient environ 80 à 100 gènes mais ce chiffre peut varier selon les espèces (Green, 2011). Il a une taille d'environ 140 000 paires de bases. En comparaison, le génome d'une cyanobactérie telle que *Synechocystis* a une taille de 3 573 470 paires de bases et contient 3168 gènes (Martin and Herrmann, 1998). Ces différences de taille et de quantités de gènes entre le génome cyanobactérien et chloroplastique s'expliquent par un transfert massif des gènes chloroplastiques vers le génome nucléaire. Suite à l'endosymbiose, ce transfert à commencer à s'opérer de manière fréquente et par gros fragments d'ADN, provoquant la réduction de la taille du génome chloroplastique (Martin, 2003). Ceci explique également le fait qu'on estime entre 2000 et 5000 le nombre de protéines contenues dans le chloroplaste (Martin and Herrmann, 1998) alors que le génome chloroplastique ne code que pour environ 80

protéines. Ainsi, on estime qu'aujourd'hui le chloroplaste encode entre 1 et 5% seulement des protéines qu'il contient (Martin and Herrmann, 1998).

Le génome chloroplastique encode principalement des protéines impliquées dans la transcription ou la traduction de ses gènes ainsi que quelques protéines de la chaîne de transport des électrons et impliquées dans la photosynthèse (Martin and Herrmann, 1998; Green, 2011). Le génome nucléaire, quant à lui, encode des protéines impliquées dans divers mécanismes chloroplastiques tels que la transcription, la photosynthèse, le métabolisme des acides gras, la fixation du carbone ou encore la division chloroplastique.

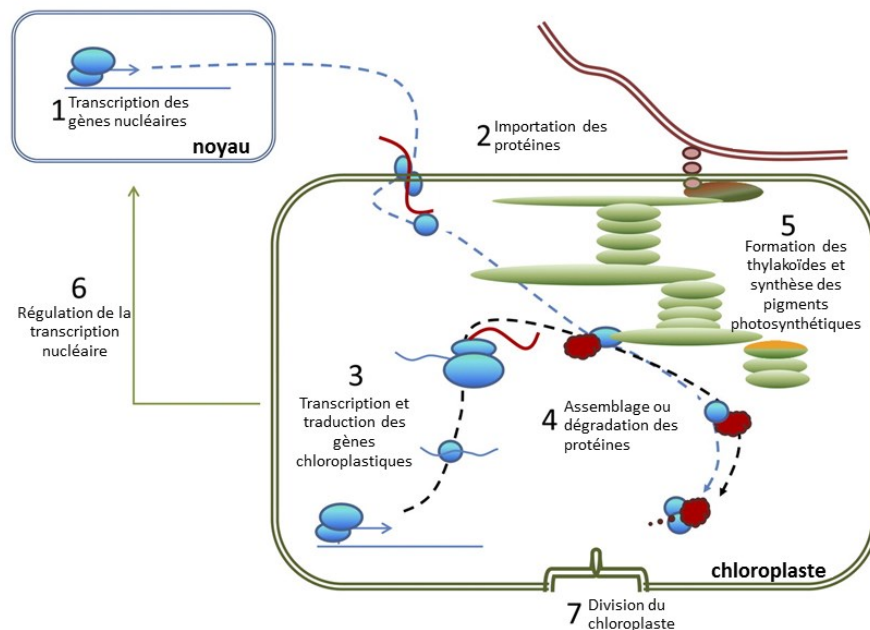
### **1.2.2. La biogénèse du chloroplaste**

Chez les dicotylédones, comme la plante modèle *Arabidopsis thaliana*, les cellules des vraies feuilles se développent de la base vers la pointe (Pyke et al., 1991; Donnelly et al., 1999). Les cellules non-différenciées, appelées cellules méristématiques, sont donc retrouvées à la base tandis que les plus différenciées (cellules palissadiques, épidermiques ou mésophylliennes) se retrouvent dans le reste de la feuille. Chez la plante modèle *Arabidopsis thaliana*, on estime que, dans les feuilles, chaque cellule du mésophylle contient environ 100 chloroplastes (Koniger et al., 2008).

Au cours du développement de la plante, les proplastides, précurseurs des chloroplastes, sont, dans un premier temps, principalement retrouvés dans les cotylédons, puis, par la suite, dans les cellules méristématiques (Pogson and Albrecht, 2011). La différenciation du proplastide en chloroplaste suit le même schéma que la différenciation des cellules méristématiques en cellules du mésophylle ou cellules palissadiques. Cette différenciation se fait donc de la base vers le bout de la feuille. Ainsi, les proplastides, principalement retrouvés à la base de la feuille, dans les cellules méristématiques, se différencient en chloroplastes, retrouvés dans le reste de la feuille, dans les cellules du mésophylle ou les cellules palissadiques. Cette différenciation peut être directe, ou en

passant par un intermédiaire dans le noir, l'étioplaste (Leon et al., 1998; Gutierrez-Nava Mde et al., 2004; Pogson and Albrecht, 2011). La différenciation cellulaire et plastidique se fait également de la base vers la pointe chez les monocotylédones.

Sept étapes distinctes sont considérées comme essentielles lors de la biogénèse chloroplastique : **1)** la transcription des gènes nucléaires encodant des protéines chloroplastiques; **2)** l'importation des protéines chloroplastiques; **3)** la transcription et la traduction des gènes chloroplastiques; **4)** l'assemblage ou la dégradation de protéines chloroplastiques; **5)** la formation des thylakoïdes et la synthèse des pigments photosynthétiques; **6)** la régulation de la transcription de gènes nucléaires par le chloroplaste; **7)** la division du chloroplaste (Figure 1) (Pogson and Albrecht, 2011). Des problèmes qui viendraient perturber l'une de ces étapes peuvent causer, par conséquent, un retard dans la biogénèse chloroplastique. On remarque que la transcription des gènes chloroplastiques est l'une des étapes primordiales lors de la biogénèse du chloroplaste. Du fait que la biogénèse se fasse au niveau de la base de la feuille, il est donc logique de retrouver un taux de transcription chloroplastique plus prononcé dans les cellules situées à ce niveau (Baumgartner et al., 1989).



**Figure 1 : Les sept étapes essentielles à la biogénèse des chloroplastes.** Les explications de la Figure sont données dans le texte page 5. Figure traduite et tirée de (Pogson and Albrecht, 2011).

### **1.3. La signalisation rétrograde du chloroplaste au noyau**

Bien que, comme nous l'avons vu précédemment, un transfert des gènes du chloroplaste vers le noyau a eu lieu, le chloroplaste n'a toutefois pas perdu tout contrôle sur l'expression de ces gènes. En effet, il existe un signal, appelé signal rétrograde, émanant du chloroplaste et permettant de réguler leur expression (revues dans (Nott et al., 2006; Fernandez and Strand, 2008)). Cette signalisation rétrograde peut avoir plusieurs origines et permet de coordonner l'expression des gènes nucléaires en fonction de la physiologie chloroplastique (quantité de lumière reçue, problème transcriptionnel ou traductionnel, etc.)

La signalisation rétrograde par le « signal redox » concerne l'état d'oxydo-réduction de certains des composants de la chaîne de transport des électrons. Celui-ci peut varier en fonction de la quantité de lumière reçue par le chloroplaste. Cet état peut donc être utilisé



comme senseur de l'environnement lumineux afin de transmettre un signal au noyau (Bellafiore et al., 2005). La principale kinase impliquée dans ce mécanisme de signalisation est la kinase chloroplastique STN7 (Pesaresi et al., 2009; Pesaresi et al., 2010). Cette kinase permettrait, en cas de déséquilibre dans la stœchiométrie des photosystèmes, une réponse à court terme et à long terme. La réponse à court terme consiste en une modification rapide du niveau de protéines dans les photosystèmes et la réponse à long terme permet la modification de l'expression de gènes photosynthétiques nucléaires (Pesaresi et al., 2009; Pesaresi et al., 2010).

Un autre exemple de signalisation rétrograde peut trouver son origine des espèces réactives oxygénées (ROS) produites dans le chloroplaste. En effet, la chaîne de transport des électrons produit deux types de ROS qui peuvent être dommageables pour le chloroplaste et la cellule végétale, l'oxygène singulet  $^1\text{O}_2$  et le peroxyde d'hydrogène  $\text{H}_2\text{O}_2$  (Asada, 2006). Le premier est produit par le photosystème II tandis que le second est produit par le photosystème I. Lorsque la lumière augmente, le niveau de production de ces ROS augmente également. Ainsi, un mécanisme de signalisation permet au chloroplaste de réguler l'expression de protéines de détoxification des ROS encodées dans le noyau. Ces deux types de ROS agissent toutefois par deux mécanismes distincts.

Le peroxyde d'hydrogène  $\text{H}_2\text{O}_2$  est à l'origine d'une signalisation rétrograde du chloroplaste au noyau par l'intermédiaire des protéines tAPX (thylakoid ascorbate peroxydase) et sAPX (stroma ascorbate peroxydase) qui semblent jouer un rôle dans la transmission du signal vers le noyau (Maruta et al., 2010). Leur importance est démontrée mais leur fonctionnement est encore inconnu.

L'oxygène singulet  $^1\text{O}_2$ , quant à lui, signale par l'intermédiaire des protéines EXECUTER. Ceci a été démontré par l'utilisation du mutant *flu*. Celui-ci accumule du PChilde (précurseur de la chlorophylle) dans le noir et produit une grosse quantité de  $^1\text{O}_2$  lors d'un passage à la lumière, provoquant un blanchiment de la plante et sa mort (op den

Camp et al., 2003). Ce mutant a ainsi pu être utilisé dans un criblage génétique afin de trouver les protéines nécessaires à la transduction d'un signal du  $^1\text{O}_2$ . En effet, l'absence de ces protéines empêche la mort de la plante lors d'un passage brusque à la lumière. Il a ainsi été montré que EXECUTER 1 et 2 sont les principales protéines impliquées dans la signalisation du  $^1\text{O}_2$  vers le noyau (Wagner et al., 2004; Lee et al., 2007). Un second criblage du même type a permis d'identifier les mutants *soldat* (*singlet oxygen-linked death activator*) qui permettent également de supprimer la mort de la plante reliée à la surproduction de  $^1\text{O}_2$  (Coll et al., 2009; Meskauskiene et al., 2009). Toutefois, il est intéressant de noter que, contrairement aux protéines EXECUTER1 et 2, les protéines SOLDAT8 et SOLDAT10 ne sont pas impliquées directement dans la signalisation rétrograde par l'intermédiaire du  $^1\text{O}_2$ . Elles semblent plutôt être responsable d'un problème dans l'homéostasie protéique, provoquant ainsi un signal rétrograde vers le noyau et empêchant par la suite la mort causée par la signalisation du  $^1\text{O}_2$  (Coll et al., 2009; Meskauskiene et al., 2009). L'une de ces protéines (SOLDAT8) est la protéine SIG6, un facteur de transcription chloroplastique sur lequel nous reviendrons plus tard.

Les tétrapyrroles, une famille de molécules comprenant entre autres l'hème ou la chlorophylle, sont également à l'origine d'une signalisation rétrograde. En effet, un défaut dans la voie de biosynthèse des tétrapyrroles cause la répression de certains gènes nucléaires, tel que *LHCB1.2*, encodant des protéines des photosystèmes I et II (Strand et al., 2003; Pontier et al., 2007). Ce mécanisme permettrait de réguler l'efficacité photosynthétique en fonction du niveau de chlorophylle contenu dans le chloroplaste. Cette voie de signalisation passerait notamment par une accumulation de la molécule Mg-ProtoIX (Protoporphyrine-IX associée au Magnésium), précurseur de la chlorophylle, ainsi que par les protéines GUN (GUN2 à GUN5) qui sont des enzymes directement impliquées dans la voie de biosynthèse des tétrapyrroles (Susek et al., 1993; Larkin et al., 2003).

Finalement, la signalisation rétrograde peut tirer son origine de l'homéostasie protéique du chloroplaste. Une bonne homéostasie protéique exige un bon niveau d'importation de protéines encodées dans le noyau, ou encore une transcription et une

traduction des gènes chloroplastiques normales. Ainsi, si l'homéostasie protéique est compromise, un signal rétrograde du chloroplaste permet de réguler l'expression des gènes nucléaires. Par exemple, une mutation dans la machinerie d'importation des protéines dans le chloroplaste cause une répression des gènes nucléaires photosynthétiques (Kakizaki et al., 2009). Également, l'utilisation de drogues ciblant l'expression des gènes chloroplastiques, telles que la tagétitoxine ou la rifampicine, inhibiteurs de la transcription chloroplastique, ou encore la lincomycine ou l'érythromycine, inhibiteurs de la traduction chloroplastique, est également capable d'induire un changement transcriptionnel nucléaire (Rapp and Mullet, 1991; Sullivan and Gray, 1999; Woodson et al., 2012). Ces observations appuient donc l'existence d'une signalisation rétrograde en cas de problème au niveau de l'expression des gènes chloroplastiques.

Les différentes voies de signalisation mentionnées plus haut semblent converger vers une seule et même protéine qui permettrait d'intégrer les signaux chloroplastiques vers le noyau. Cette protéine, GUN1, jouerait donc un rôle primordial dans la signalisation rétrograde (Koussevitzky et al., 2007). Toutefois, GUN1 étant strictement localisée dans le chloroplaste, il faut un relais moléculaire ou protéique pour acheminer le signal vers le génome nucléaire. Ce n'est que récemment qu'un groupe a mis en évidence le rôle du facteur de transcription PTM. Celui-ci est fixé sur la membrane externe du chloroplaste et, lors de la transduction du signal, est clivé, libérant ainsi son domaine N-terminal qui active la transcription du gène *ABI4* par modification des histones (Sun et al., 2011). Finalement, la protéine ABI4 jouerait un rôle d'activateur ou de répresseur transcriptionnel dans le noyau pour les gènes encodant des protéines chloroplastiques (Koussevitzky et al., 2007).

## **1.4. La transcription dans le chloroplaste**

### **1.4.1. Les ARN polymérases chloroplastiques**

Étant donné que le chloroplaste possède son propre génome, il se doit d'effectuer les principales fonctions associées à sa maintenance telles que la réplication, la réparation ou encore la transcription. Cette dernière est effectuée par des ARN polymérases chloroplastiques. Dans le chloroplaste, on retrouve trois ARN polymérases : une PEP, pour Plastid-Encoded Polymerase, et deux NEPs, pour Nuclear-Encoded Polymerases. Ces deux types d'ARN polymérases ont été pour la première fois différenciés sur la base de leur sensibilité à la rifampicine, un antibiotique inhibant l'ARN polymérase bactérienne (Pfannschmidt and Link, 1994).

La Plastid-Encoded Polymerase (PEP) est l'ARN polymérase encodée par le génome chloroplastique. Elle se compose de 4 sous-unités :  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\beta'$  et  $\beta''$ , de tailles respectives 38, 120, 85 et 185 kDa (Liere and Börner, 2007). Ces quatre sous-unités sont encodées respectivement par les gènes chloroplastiques *RPOA*, *RPOB*, *RPOC1* et *RPOC2*. Ces trois derniers sont transcrits sous forme d'opéron sur le génome chloroplastique. L'activité transcriptionnelle de la PEP est diminuée en présence de tagétitoxine ou de rifampicine, des inhibiteurs de la transcription bactérienne (Liere and Maliga, 1999; Kuhn et al., 2007; Liere et al., 2011). Ceci s'explique par l'homologie entre la PEP et l'ARN polymérase bactérienne (Severinov et al., 1996). Cette homologie est peu étonnante étant donnée l'origine endosymbiotique du chloroplaste. De plus, les promoteurs utilisés par la PEP sont similaires aux promoteurs bactériens du type  $\sigma^{70}$  chez *E. coli* et comprennent deux éléments : l'élément -35 (TTGaca) et l'élément -10 (TATAaT) (Liere et al., 2011). On remarque finalement que cette ARN polymérase est déjà présente dans les graines d'*Arabidopsis thaliana*, avant même la germination de la plante, puisque l'ARN codant pour les sous-unités de la PEP ainsi que les protéines y sont retrouvées (Demarsy et al., 2006).

Les NEPs (Nuclear-Encoded Polymerase) sont des ARN polymérases encodées dans le génome nucléaire. Chez *Arabidopsis*, il en existe deux : RpoTmp (RNA polymerase Targeted to mitochondria and plastid) et RpoTp (RNA polymerase Targeted to plastid) d'un poids moléculaire d'environ 110 kDa. Le nombre de NEPs et leur localisation peuvent varier selon l'espèce (Liere et al., 2011). Elles sont de type phagique du fait de leur similarité avec l'ARN polymérase du bactériophage T3/T7 (Liere et al., 2011). RpoTp est strictement localisée dans le chloroplaste (Hedtke et al., 1999) tandis que RpoTmp est doublement localisée dans le chloroplaste et la mitochondrie (Hedtke et al., 2000). Les premières preuves de la présence de ces ARN polymérases proviennent du fait que la transcription chloroplastique n'est pas complètement abolie même en l'absence de la PEP (Krause et al., 2000). De plus, au moins deux ARN polymérases semblent coexister dans le chloroplaste, l'une sensible à la rifampicine ou la tagétitoxine et l'autre non (Pfannschmidt and Link, 1997; Sakai et al., 1998). Ces deux NEPs semblent avoir des fonctions redondantes (Hricova et al., 2006). Cependant, certains gènes chloroplastiques seraient préférentiellement transcrits par l'une des deux ARN polymérases sans que l'autre ne puisse compenser son absence (Swiatecka-Hagenbruch et al., 2008). Une mutation dans le gène encodant la polymérase RpoTp démontre l'importance de cette NEP dans la biogénèse chloroplastique ainsi que dans la prolifération des cellules du mésophylle (Hricova et al., 2006). Les NEPs sont, comme la PEP, déjà présentes dans les graines chez *Arabidopsis thaliana* (Demarsy et al., 2006).

Il est intéressant de noter que les gènes encodant les sous-unités de la PEP sont sous le contrôle transcriptionnel des NEPs (Hajdukiewicz et al., 1997). En d'autres termes, ce sont les NEPs qui sont responsables de la transcription du gène *RPOA* et de l'opéron *RPOB*, *PROC1* et *RPOC2*. En 2005, Hanaoka et al. proposèrent un modèle selon lequel l'ARN de transfert chloroplastique normalement chargé avec la glutamate (ARNt<sup>Glu</sup>), transcrit par la PEP, serait responsable du passage d'un mode de transcription majoritairement dépendant des NEPs, au début du développement du chloroplaste, à un mode majoritairement dépendant de la PEP par la suite (Hanaoka et al., 2005). Ainsi, selon eux,

les NEPs permettraient la transcription de la PEP qui, à son tour, favoriserait la transcription de l'ARNt<sup>Glu</sup> qui, en retour, inhiberait les NEPs. Toutefois, ce modèle est controversé. En effet, d'une part, les deux types de polymérases, PEP et NEPs, sont retrouvées dans les graines, mettant ainsi en doute le fait que les NEPs soient les seules polymérases ayant une activité dans la transcription chloroplastique lors des premiers stades de développement (Demarsy et al., 2006). D'autre part, les NEPs semblent encore actives dans les feuilles matures, montrant ainsi que leur rôle dépasse la simple biogénèse chloroplastique (Zoschke et al., 2007). Finalement, il semblerait que plusieurs types d'ARNt puissent fixer les NEPs de manière non-spécifique (Liere et al., 2011).

#### **1.4.2. Les promoteurs chloroplastiques**

Les trois ARN polymérases présentes dans le chloroplaste ne transcrivent pas les mêmes gènes. En effet, les gènes chloroplastiques sont classés selon leur mode principal de transcription. On distingue donc les gènes de classe I, de classe II et finalement de classe III.

Les gènes de classe I sont transcrits, dans un contexte normal, par la PEP exclusivement (Hajdukiewicz et al., 1997). Ces gènes sont surtout impliqués dans la photosynthèse, tels que *RBCL*, *PSAA*, *PSBA*, *PSAB*, *TRNE* ou *TRNV*. Les gènes de classe II, quant à eux, peuvent être transcrits par les deux types de polymérases PEP ou NEPs (Hajdukiewicz et al., 1997). Ces gènes sont catégorisés comme des gènes de maintenance ou impliqués dans la transcription ou la traduction. On y retrouve la majorité des gènes chloroplastiques tels que *ATPB*, *ATPE* ou *NDHC*. Finalement, les gènes de classe III sont exclusivement transcrits par les NEPs (Hajdukiewicz et al., 1997). On y retrouve notamment les gènes *CLPP*, *ACCD*, *RPOA*, *RPOB*, *RPOC1* et *RPOC2*.

On remarque donc que la transcription du génome chloroplastique est un mécanisme bien coordonné avec des gènes assignés à un type d'ARN polymérase particulier. La raison de cette séparation des modes de transcription n'est toutefois pas connue.

Récemment, une étude complète du transcriptome chloroplastique de l'orge commune (*Hordeum vulgare*) a été menée par Zhelyazkova et al. Cette étude avait pour but de séquencer les transcrits afin de comparer le transcriptome de chloroplastes de plantes de type sauvage avec celui de chloroplastes de plantes dépourvues de PEP (Zhelyazkova et al., 2012). Particulièrement, les auteurs ont vérifié quels étaient les sites d'initiation retrouvés sur les transcrits afin de déduire les promoteurs utilisés lors de la transcription. L'utilisation d'au moins 222 promoteurs NEPs-dépendants, en principe inutilisés dans la plante de type sauvage, a été observée dans les plantes dépourvues de PEP (Zhelyazkova et al., 2012). Les auteurs suggèrent que ces promoteurs pourraient être utilisés dans un contexte anormal comme, dans l'étude, en cas d'absence de la PEP (Zhelyazkova et al., 2012). Une autre étude de Schweer et al. en 2006 a également permis de constater que certains promoteurs de NEPs, non utilisés dans un contexte normal, pourraient permettre de restaurer la transcription chloroplastique dans un mutant *sig6*, dont l'activité de la PEP est déficiente (Schweer et al., 2006). Les auteurs ont nommé ces promoteurs des promoteurs SOS puisqu'ils interviennent uniquement dans le but de secourir la transcription des gènes chloroplastiques. Selon eux, les NEPs joueraient donc un rôle de sauvetage en cas de problème transcriptionnel chloroplastique (Schweer et al., 2006).

### **1.4.3. Les facteurs associés à la PEP**

#### **a- Rôle des protéines PTACs**

La PEP se retrouve sous une forme soluble comprenant majoritairement les quatre sous-unités principales, mais se retrouve également sous une forme insoluble appelée TAC (Transcriptionally Active Chromosome) (Suzuki et al., 2004; Pfalz et al., 2006; Steiner et al., 2011). Ce gros complexe, composé d'ADN, d'ARN ainsi que de multiples protéines est capable de transcription *in vitro*. Ces protéines sont susceptibles d'être impliquées dans le mécanisme transcriptionnel chloroplastique en association avec la PEP.

Dans un premier temps, 13 protéines ont été identifiées par spectrométrie de masse (Suzuki et al., 2004). En plus des 4 sous-unités principales composant le cœur de l'ARN polymérase de type bactérienne, on retrouve entre autres les gyrases A et B, similaires aux topoisomérases bactériennes de type II, responsables du surenroulement négatif de l'ADN (Wall et al., 2004). Les mutations *gyra* et *gyrb* sont létales dès les premiers stades de développement. On retrouve également des superoxyde dismutases, impliquées dans la détoxification des ROS, une thioredoxine TRXZ, dont la mutation provoque un phénotype albinos associé avec une réduction du niveau des transcrits de Classe I (PEP-dépendants) (Arsova et al., 2010), et les protéines-kinases FLN1 et FLN2, qui semblent être des cibles de la thioredoxine TRXZ (Gilkerson et al., 2012). La présence de ces protéines dans le complexe TAC suggère donc l'importance de ces protéines dans la transcription ainsi que la biogénèse chloroplastique. Leur rôle spécifique en association avec la PEP n'est toutefois pas élucidé.

Plus récemment, 18 protéines additionnelles ont été identifiées (Pfalz et al., 2006). Ces protéines ont été nommées PTAC1-18 pour (Plastid Transcriptionally Active Chromosome 1 à 18). Bien que toutes ces protéines n'aient pas encore été étudiées afin de comprendre leurs rôles, diverses études ont déjà montré l'importance de certaines d'entre elles dans la transcription chloroplastique par la PEP. Des mutants *ptac2*, *ptac6* et



*ptac12* présentent des phénotypes albinos ou un problème dans la biogénèse chloroplastique (Pfalz et al., 2006). Ces mutations provoquent également une diminution du niveau de transcription de gènes transcrits par la PEP. Elles semblent donc nécessaires à la transcription chloroplastique. Le mutant *ptac3* présente également un phénotype albinos et une diminution du niveau de transcrits de Classe I (Yagi et al., 2012). Les auteurs suggèrent que cette protéine joue un rôle dans le processus d'élongation de la transcription. Le mutant *ptac4* possède également un phénotype albinos ainsi qu'une diminution de la photosynthèse (Zhang et al., 2012). Toutefois, ce phénotype proviendrait d'un défaut de formation des thylakoïdes lors de la biogénèse. À savoir si cette protéine possède un rôle direct dans la transcription chloroplastique reste une question sans réponse. La protéine PTAC16 pourrait servir de lien entre l'état d'oxydo-réduction des composantes de la chaîne de transport, signal capté par la kinase STN7 (voir la signalisation rétrograde), et la régulation de l'expression du génome chloroplastique dans l'acclimatation à long-terme aux changements lumineux (Ingelsson and Vener, 2012). La protéine PTAC14 semble également jouer un rôle important dans l'activité de la PEP (Gao et al., 2011). Plus récemment, le rôle de la protéine PTAC7 dans la transcription chloroplastique a également été étudié (Yu et al., 2012). Le mutant *tac7* montre ainsi, comme les autres mutants précédemment mentionnés, un phénotype albinos et une réduction des transcrits de Classe I, suggérant un rôle essentiel de PTAC7 dans la transcription PEP-dépendante.

Bien que certaines protéines identifiées par Pfalz et al. en 2006 semblent jouer un rôle important dans la transcription chloroplastique, beaucoup de ces protéines restent non étudiées. D'autres, comme les protéines PTAC1 et 11, ont été intensément étudiées pour divers rôles autres que dans la biogénèse ou la transcription chloroplastique. Ainsi, les mutants *ptac1* (*why1*) et *ptac11* (*why3*) semblent normaux bien que le double mutant *why1why3* présente un phénotype de variégation associé avec une morphogénèse anormale des chloroplastes (Maréchal et al., 2009). Ce phénotype proviendrait du rôle des protéines PTAC1 (WHY1) et PTAC11 (WHY3) dans le maintien de la stabilité génomique

chloroplastique. En 2008 toutefois, une étude chez le maïs semblait indiquer le rôle essentiel de la protéine WHY1 dans la biogénèse chloroplastique (Prikryl et al., 2008).

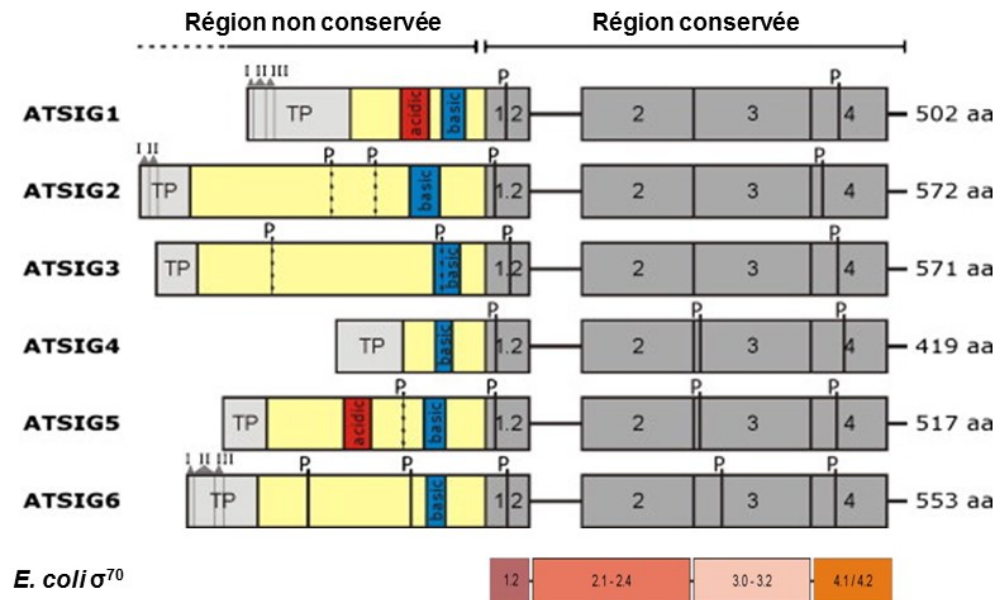
Récemment, une étude réduit le nombre de protéines indispensables pour l'activité de la PEP à 10 en purifiant uniquement l'activité ARN polymérase dans l'extrait protéique des chloroplastes (Steiner et al., 2011). Ces protéines sont 2 superoxydes dismutases (SOD2 et SOD3), FLN1, PTAC2, PTAC3, PTAC6, PTAC10, PTAC12, PTAC14 et la thioredoxine TRXZ. Les auteurs leur attribuent le nom de PAPs (PEP-Associated Proteins). Ils montrent ainsi que ces mutants présentent tous un phénotype albinos et sont incapables de pousser sans un apport de sucrose. Selon les auteurs, l'absence de l'une ou l'autre de ces protéines empêcherait la formation et l'assemblage du complexe PEP/PAP, résultant finalement en l'inactivité de la PEP dans les chloroplastes (Steiner et al., 2011). Cela provoquerait finalement l'apparition du phénotype albinos et la diminution des transcrits de Classe I dans les mutants.

#### **b- Rôle des facteurs sigmas**

En plus des protéines précédentes, associées à la PEP, un certains nombres de facteurs sigmas sont également retrouvés en association avec la PEP. Chez *Arabidopsis thaliana*, on retrouve 6 facteurs sigmas différents notés SIG1-6. Ces facteurs sont similaires aux facteurs  $\sigma^{70}$  retrouvés chez *E. coli* (revues dans (Lysenko, 2007; Schweer et al., 2010a)).

Ces facteurs sigmas possèdent deux principales régions : une région C-terminale, conservée entre les six facteurs sigmas et homologue aux facteurs  $\sigma^{70}$  bactériens, et une région N-terminale non conservée entre les différents facteurs sigmas et non retrouvée chez les facteurs  $\sigma^{70}$  (Figure 2). La région conservée comporte différents domaines : deux domaines permettant la fixation à l'ARN polymérase (domaine 2.1 et 3), un domaine de formation d'un cœur hydrophobe (2.2), un domaine de désappariement de l'ADN (2.3), un domaine de reconnaissance du motif -10 des promoteurs de la PEP (2.4) et deux domaines

permettant la reconnaissance du motif -35 (4.1 et 4.2) (Liere et al., 2011). Ces facteurs sont encodés dans le noyau puis ciblés au chloroplaste. Il est toutefois intéressant de noter que le facteur SIG5 est retrouvé également dans la mitochondrie malgré l'absence de PEP dans celle-ci (Yao et al., 2003). Également, chez le maïs, un facteur sigma semble ciblé aux chloroplastes ainsi qu'aux mitochondries (Beardslee et al., 2002). Le rôle mitochondrial de ces facteurs n'est pas encore élucidé bien que certains auteurs suggèrent qu'ils pourraient servir de facteurs de transcription en association avec les NEPs retrouvées dans les mitochondries (Beardslee et al., 2002; Liere et al., 2011).



**Figure 2: Représentation schématique des facteurs sigma 1-6 chloroplastiques chez *Arabidopsis thaliana* et des facteurs de type σ<sup>70</sup> bactérien.** La région conservée en C-terminal est en gris foncé, la région non conservée en N-terminal est en beige et le peptide de transit (TP) est indiqué en gris pâle. Les sites de phosphorylation potentiels sont indiqués par une barre surmontée d'un P. La taille, en acides aminés, des protéines est indiquée à leur droite sauf pour les facteurs de type σ<sup>70</sup> bactérien. Figure tirée et modifiée de (Schweer et al., 2010a).

Les facteurs sigmas jouent trois rôles principaux dans le chloroplaste : assurer une spécificité de promoteurs pour un lot de gènes particuliers par l'association entre un facteur sigma spécifique et la PEP sur l'ADN, permettre l'intégration de signaux

environnementaux pour la modulation de l'expression des gènes chloroplastiques, et, finalement, permettre la biogénèse chloroplastique. Toutefois, tous les facteurs sigmas n'assurent pas les trois fonctions précédemment mentionnées. Ainsi, le facteur SIG6 est principalement impliqué dans la biogénèse chloroplastique et la transcription générale dès les premiers stades de développement (Ishizaki et al., 2005). Par la suite, il jouerait un rôle de facteur de spécificité pour, entre autres, les gènes *ATPB* ou *ATPE* (Loschelder et al., 2006). Le facteur SIG2 semble également impliqué dans la biogénèse chloroplastique et la transcription de certains gènes par la suite (Kanamaru et al., 2001). Les facteurs SIG3 et SIG4, quant à eux, sont impliqués dans la transcription de gènes particuliers (e.g. *NHDF* pour SIG4 (Favory et al., 2005), *PSBN* pour SIG3 (Zghidi et al., 2007), bien qu'un rôle de SIG3 et SIG4 dans la biogénèse chloroplastique soit suggéré par leur expression tôt dans le développement (Privat et al., 2003; Ishizaki et al., 2005). La protéine SIG5 joue principalement un rôle d'intégration de signaux environnementaux et de régulation de la transcription en cas de stress chloroplastique (Nagashima et al., 2004). Finalement, le facteur SIG1 permet une adaptation en cas de changements lumineux ou en réponse à des phytohormones, mais est également responsable de la transcription spécifique du gène *PSAA* (Tozawa et al., 2007; Hanaoka et al., 2012).

On remarque donc que chacun des facteurs sigma semble avoir un rôle spécifique. Toutefois, il semble que les facteurs peuvent contrebalancer la perte d'un d'entre eux. Schweer et al. suggèrent que, en l'absence de la protéine SIG6, un autre facteur sigma pourrait être utilisé pour permettre de restaurer la transcription des gènes en principe pris en charge par le facteur SIG6 (Schweer et al., 2006).

Les facteurs sigmas peuvent être eux-mêmes régulés par d'autres protéines. Cette régulation peut se faire par interaction protéique ou par phosphorylation. Par exemple, la protéine SIB1 (Sigma factor-Binding protein 1) interagit avec le facteur SIG1 et serait un régulateur négatif de son activité (Xie et al., 2010). La phosphorylation par des protéines kinases chloroplastiques est également un moyen de régulation de l'activité des facteurs

sigmas. Au moins deux kinases en sont responsables : cpCK2 (chloroplast Casein Kinase 2) et CSK (Chloroplast Sensor Kinase). Le facteur SIG1, par exemple, peut être phosphorylé par ces deux kinases, ce qui entraîne la diminution de la transcription du gène *PSAA* par la PEP associée à SIG1, mais est sans impact sur la transcription du gène *PSBA*, pourtant lui aussi dépendant de la PEP-SIG1 (Puthiyaveetil et al., 2010; Shimizu et al., 2010). La protéine CSK est capable de s'autophosphoryler en réponse à un changement d'état d'oxydo-réduction des composants de la chaîne de transport des électrons, la rendant ainsi active. Elle phosphoryle ensuite la protéine cpCK2 ainsi que le facteur sigma SIG1 (Puthiyaveetil et al., 2008; Puthiyaveetil et al., 2010). Cette régulation permet ainsi de moduler le niveau de photosynthèse entre les deux photosystèmes I et II en faisant varier la transcription des gènes *PSAA* et *PSBA* par la PEP en association avec SIG1. La kinase cpCK2 permet également la régulation du facteur sigma SIG6 (Schweer et al., 2010b).

## **1.5. Le facteur sigma SIG6**

### **1.5.1. Structure et fonction de SIG6**

Dans cette étude, nous nous intéressons particulièrement au facteur sigma SIG6. Le gène *SIG6* (AT2G36990) se compose de neuf exons séparés par huit introns. Il encode une protéine de 547 acides aminés ayant un poids moléculaire d'environ 62 kDa. Cette protéine, comme les autres facteurs sigmas, possède une région C-terminale conservée qui contient les domaines de liaison à l'ADN ainsi que les domaines de recrutement de l'ARN polymérase. La partie N-terminale, quant à elle, contient, entre autres, le peptide de transit, permettant la localisation au chloroplaste (Figure 2) (Fujiwara et al., 2000).

Le gène *SIG6* est particulièrement exprimé lors des premiers stades de développement de la plante (Demarsy et al., 2006). Le facteur sigma SIG6 est, en fait, considéré comme un facteur sigma général lors de la biogénèse chloroplastique. En effet, un mutant *sig6* présente un phénotype de cotylédons pâles (Ishizaki et al., 2005;

Loschelder et al., 2006). De plus, l'ultrastructure chloroplastique, observée par microscopie électronique, montre une absence quasi-totale de thylakoïdes (Ishizaki et al., 2005) ainsi qu'une déficience en chlorophylle (Ishizaki et al., 2005; Chi et al., 2010). Le phénotype du mutant *sig6* est visible sur les cotylédons dès la germination de la graine, puis disparaît après 5 jours (Ishizaki et al., 2005) ou perdure en laissant des cotylédons blancs (Loschelder et al., 2006) selon les lignées utilisées. Le phénotype est par contre limité à cette région car les premières vraies feuilles ne présentent aucun phénotype (Ishizaki et al., 2005; Loschelder et al., 2006). Les auteurs en concluent donc que le rôle du facteur sigma 6 dans la biogénèse chloroplastique se limite aux chloroplastes des cotylédons mais qu'un autre facteur sigma pourrait être utilisé dans la biogénèse chloroplastique dans les vraies feuilles. Ainsi, Loschelder et al. proposent un modèle dans lequel l'activité relative du facteur sigma 6 est importante aux premiers stades puis diminue ensuite, faisant place aux autres facteurs sigmas 1-5 et aux NEPs (Figure 3) (Loschelder et al., 2006). Toutefois, il conserve une activité durant le reste du développement de la plante, notamment afin d'assurer la transcription des gènes dépendants de la PEP en association avec SIG6 tel que *ATPB* (Figure 3) (Loschelder et al., 2006).



**Figure 3: Modèle schématisant l'activité relative de la protéine SIG6 en fonction du temps comparativement aux autres facteurs sigma ou aux NEPs.** L'activité relative de la protéine SIG6 est représentée en blanc tandis que l'activité relative des autres facteurs sigmas ou des NEPs est représentée en gris. Le rôle précoce correspond au rôle de la protéine SIG6 dans la biogénèse chloroplastique puis le rôle persistant correspond à son rôle dans la transcription de certains gènes tels que *ATPB* ou *PSBA*. Figure tirée, traduite et adaptée de (Loschelder et al., 2006).

La protéine SIG6 permet donc la transcription générale des gènes chloroplastiques lors de la biogénèse chloroplastique. Toutefois, cette transcription à l'aide de SIG6 se limite aux gènes dépendants de la PEP (Classe I et Classe II). Ces gènes doivent donc posséder un promoteur de la PEP contenant les motifs -10 et -35 (Ishizaki et al., 2005). C'est par exemple le cas de gènes tels que *RBCL*, *PSAA*, *PSBA*, *ATPB* ou encore *TRNE*. Des analyses par immuno-buvardage de type Northern ont ainsi permis de montrer que, dans un mutant *sig6*, on observe une diminution générale de la quantité de transcrits chloroplastiques de Classe I (Ishizaki et al., 2005; Loschelder et al., 2006). Cela se traduit également par une diminution du niveau des protéines correspondantes dans le mutant *sig6* (Woodson et al., 2012). Cette sous-expression revient toute fois à la normale après 8 jours de développement et reste normale jusqu'à la fin du cycle de vie de la plante (Loschelder et al., 2006). Deux gènes présentent toutefois une différence tout au long du développement et de la vie de la plante : les gènes *ATPB* et *ATPE*. Ces gènes sont transcrits en opéron et sont dépendants du facteur SIG6. Ainsi, dans le mutant, on observe une

diminution de la quantité de transcrits même au-delà de la biogénèse chloroplastique (Loschelder et al., 2006). Cela souligne le double rôle de la protéine SIG6, dans un premier temps, dans la biogénèse chloroplastique (rôle précoce), puis, par la suite, dans la transcription de certains gènes (*ATPB* et *ATPE*) (rôle persistant) (Figure 3).

La diminution de la transcription des gènes de Classe I ou II observée dans le mutant est toutefois compensée par l'apparition de nouvelles formes de transcrits de plus haut poids moléculaire (Loschelder et al., 2006). L'explication est fournie par Schweer et al. qui montrent que des promoteurs plus en amont du gène, appelés promoteurs SOS, peuvent permettre de transcrire plusieurs gènes à la fois et, ainsi, compléter la perte des transcrits normaux (Schweer et al., 2006). Ces promoteurs sont utilisés par les NEPs. En partant plus en amont, ces promoteurs SOS NEPs-dépendants permettent la transcription de gènes, en principe transcrits à l'aide de promoteurs dépendants de la PEP, sous la forme d'un opéron. C'est par exemple le cas de *RBCL*, un gène de Classe I, qui, dans un mutant *sig6* est exprimé sous la forme d'un transcrit de haut poids moléculaire dans lequel les transcrits pour *ATPB* ou *ATPE* sont également présents (Loschelder et al., 2006; Schweer et al., 2006). Ce mécanisme de compensation transcriptionnel dans le mutant *sig6*, commençant dès 4 jours de développement mais atteignant son maximum après 8 jours, permettrait ainsi la disparition du phénotype de cotylédons pâles après 8 jours (Loschelder et al., 2006).

Chez le mutant *sig6*, on observe une augmentation globale de la transcription des gènes de Classe III (NEP-dépendants) par rapport à une plante de type sauvage (Ishizaki et al., 2005; Loschelder et al., 2006). Emanuel et al. ont montré que, chez l'orge, une déficience en ribosomes chloroplastiques provoquait une augmentation de la transcription des gènes nucléaires des NEPs (*RPOTP* et *RPOTPM*) qui, à son tour, entraînait une augmentation du niveau de transcrits des gènes de Classe III (Emanuel et al., 2004). L'expression accrue des gènes *RPOTP* et *RPOTPM* serait vraisemblablement due à la signalisation rétrograde en cas de problème au niveau du PGE. Ainsi, dans le cas du mutant



*sig6*, le problème de transcription général dès les premiers stades de développement pourrait être à l'origine d'un signal rétrograde entraînant l'expression des NEPs et favorisant, par conséquent, l'augmentation de l'expression des gènes de Classe III.

Récemment, Woodson et al. ont montré que, chez le mutant *sig6*, un signal rétrograde est envoyé au noyau afin de réguler l'expression des gènes nucléaires (Woodson et al., 2012). Les auteurs montrent donc que le mutant *sig6* sous-exprime les PhANGs (Photosynthesis Associated Nuclear Genes), gènes nucléaires encodant des protéines impliquées dans la photosynthèse. Ainsi, des gènes tels que *LHCB1.2*, *LHCB2.2* ou *RBCS2B* sont sous-exprimés de deux à quatre fois comparativement à une plante de type sauvage (Woodson et al., 2012). Ce signal rétrograde semble intégré par la protéine GUN1 (voir plus haut) puisqu'un double mutant *sig6gun1* abolit la signalisation rétrograde et continue de sous-exprimer les gènes chloroplastiques (Woodson et al., 2012). En examinant les résultats des expériences de micro-puces à ARN, permettant de comparer l'expression des gènes entre le mutant et la plante de type sauvage, on observe que le gène nucléaire encodant pour la NEP RpoTp semble être l'un des gènes les plus surexprimés dans le mutant *sig6* (Table S6 dans (Woodson et al., 2012)). Ceci suggère donc qu'un signal rétrograde pourrait être généré dans le mutant *sig6*, permettant d'augmenter la quantité de NEP RpoTp présente dans le chloroplaste et, ainsi, favoriser la transcription des gènes de Classe III. Ceci permettrait aussi de compenser la transcription de l'ensemble des gènes de Classe I et II par l'utilisation de promoteurs SOS.

### **1.5.2. Régulation de l'activité de SIG6**

Une étude a été réalisée en 2009 par Schweer et al. afin de vérifier l'impact de la portion N-terminal (région non conservée) et C-terminal (région conservée) dans l'activité transcriptionnelle du facteur SIG6. Pour cela, les auteurs ont réintroduit les portions N-terminal ou C-terminal de la protéine SIG6 dans un mutant *sig6*. Les auteurs ont ainsi remarqué que la partie N-terminal semblait suffisante pour compléter le phénotype

du mutant *sig6* ou pour permettre de compléter la transcription, dans ce mutant, d'un des gènes chloroplastiques dépendants de SIG6, le gène *PSBA* (Schweer et al., 2009). De manière surprenante, il semble donc que la portion ne contenant pas le domaine de liaison à l'ADN soit malgré tout suffisante pour remplir la fonction de la protéine SIG6. Toutefois, lorsque les auteurs tentent de réintroduire la partie C-terminal seulement, ils observent un effet délétère sur les plantes, probablement dû à un effet compétiteur par rapport à d'autres facteurs sigmas, dont la portion en C-terminal est conservée. En plus de ne pas compléter le phénotype, celui-ci semble se propager également aux feuilles subséquentes (Schweer et al., 2009). Également, on remarque un effet inhibiteur sur l'ensemble de la transcription chloroplastique. Les auteurs en concluent donc que la partie N-terminal du facteur SIG6 est importante et suffisante pour son activité transcriptionnelle sur certaines cibles de SIG6. Toutefois, il semble que cette portion seule de la protéine ne suffise pas à la complémentation de l'expression d'autres gènes tel que *ATPB* qui nécessiterait un facteur sigma 6 intact (N-terminal + C-terminal) pour être transcrit efficacement (Schweer et al., 2009).

Ces résultats soulignent donc l'importance de la région non conservée du facteur SIG6 dans son activité en association avec la PEP. Deux raisons peuvent l'expliquer : elle peut contenir des sites de phosphorylation ou permettre l'interaction avec d'autres protéines, qui peuvent à leur tour modifier l'activité du facteur sigma 6.

Tout d'abord, il a été montré qu'il existe de multiples sites de phosphorylation potentiels sur la protéine (Figure 2) (Schweer et al., 2010a). Schweer et al. ont vérifié chacun des sites et l'impact de leur phosphorylation sur l'activité de la protéine SIG6. Ils ont ainsi remarqué que trois sites de phosphorylation, tous situés dans la partie N-terminal et cibles de cpCK2 ou d'une autre kinase, ont un rôle majeur sur la fixation du facteur SIG6 sur le promoteur du gène *ATPB* ainsi que sur sa transcription. En effet, la phosphorylation de ces sites semble nécessaire à l'activité transcriptionnelle de SIG6 dans le cas d'*ATPB* (Schweer et al., 2010b). Il est toutefois intéressant de noter que leur phosphorylation n'a pas le même impact sur toutes les cibles de SIG6. Ainsi, la fixation du promoteur du gène

*PSBA* ou son expression ne semblent pas affectées par la phosphorylation du facteur sigma 6 (Schweer et al., 2010b).

La partie N-terminal de la protéine SIG6 permet également l'interaction avec d'autres protéines tel qu'avec la partie C-terminal de la protéine DG1 (Delayed Greening 1) (Chi et al., 2010). Cette interaction a un impact sur la transcription des gènes chloroplastiques puisqu'un double mutant *sig6dg1* présente un sévère phénotype de cotylédons et de vraies feuilles albinos ainsi qu'une diminution prononcée des transcrits de Classe I ou II. Il est également intéressant de remarquer que la surexpression de la partie C-terminal de DG1 dans une plante de type sauvage, agissant comme dominant négatif, provoque l'apparition d'un phénotype de cotylédons pâles ainsi qu'une chlorose limitée à la partie inférieure des jeunes feuilles (Chi et al., 2010). La surexpression de SIG6 dans un mutant *dg1* permet la complémentation du phénotype de cotylédons pâles de *dg1* mais pas son phénotype de chlorose sur les vraies feuilles (Chi et al., 2010). Les auteurs suggèrent que l'interaction entre les deux protéines est importante dans la transcription et la biogénèse chloroplastique dans les cotylédons uniquement et non dans les vraies feuilles. Toutefois, la non complémentation du phénotype de chlorose des vraies feuilles en présence de SIG6 mais en l'absence de DG1 peut également suggérer que la présence des deux protéines SIG6 et DG1 et leur interaction est importante dans la biogénèse chloroplastique au niveau des vraies feuilles. Cela est également corroboré par la présence de ce phénotype dans une plante exprimant le dominant négatif C-terminal de DG1, empêchant ainsi l'interaction entre DG1 et SIG6.

## **1.6. Les protéines WHIRLY chloroplastiques**

### **1.6.1. Structure des protéines WHIRLY chloroplastiques**

Chez *Arabidopsis thaliana*, on retrouve trois membres de la famille des protéines WHIRLY. WHY1 et WHY3 sont localisées au chloroplaste et une autre, WHY2, à la mitochondrie (Krause et al., 2005). Il semblerait que la protéine WHY1 localise également au noyau (Grabowski et al., 2008; Isemer et al., 2012). Les protéines WHY1 et WHY3 partagent 78% d'identité. Ces protéines sont capables de fixer l'ADN simple-brin de manière non-spécifique et de le protéger contre les nucléases (Cappadocia et al., 2010; Cappadocia et al., 2012). Elles sont également capables de déstabiliser l'ADN double-brin (Cappadocia et al., 2010). Ces protéines forment des tétramères grâce à l'interaction entre leurs résidus Lysine à la position 67 (Desveaux et al., 2005; Cappadocia et al., 2012). Cette tétramérisation semble importante pour leur fonction *in vivo*. De plus, il a été montré que ces tétramères peuvent s'agencer en hexamères, formant alors un 24-mère en forme de boule dont le cœur est vide (Cappadocia et al., 2012). Toutefois, la fonction de cet arrangement n'est pas connue à l'heure actuelle.

### **1.6.2. Rôle dans le maintien de la stabilité génomique chloroplastique**

Le rôle le mieux caractérisé des protéines WHIRLY concerne l'implication de WHY1 et WHY3 dans le maintien de la stabilité génomique du chloroplaste. En effet, de par leur capacité de fixation et de protection de l'ADN simple-brin, ces protéines sont capables de prévenir l'apparition de réarrangements génomiques chloroplastiques (Cappadocia et al., 2010; Cappadocia et al., 2012). Suite à l'apparition d'un bris double-brin dans le génome chloroplastique, des protéines permettent la réparation de ces bris. Cette réparation peut être conservatrice (e.g. par recombinaison homologue) ou non conservatrice (e.g. MMBIR). Le MMBIR (Microhomology-Mediated Break-Induced Replication) est une recombinaison non-homologue suite à l'apparition d'un bris double-brins par appariement de séquences de micro-homologies (Maréchal et al., 2009). Les protéines WHY1 et WHY3 sont capables de fixer les molécules d'ADN simple-brins formées à la suite d'une brisure dans l'ADN et,

conséquemment, de défavoriser les mécanismes de réparation non-homologues (Maréchal et al., 2009; Cappadocia et al., 2010; Cappadocia et al., 2012). On remarque donc qu'un double mutant *why1why3* présente un niveau de réarrangements génomiques chloroplastiques plus élevé qu'une plante de type sauvage (Maréchal et al., 2009). Cela a également un impact sur son phénotype puisque 5% des plantes présentent un phénotype de variégation associé à une ultrastructure anormale des chloroplastes (Maréchal et al., 2009). Les auteurs suggèrent également que WHY1 et WHY3 ont un rôle redondant dans le maintien de la stabilité génomique. Ce mécanisme de réparation peut également être assuré avec l'aide d'autres protéines telle que l'ADN polymérase chloroplastique POLIB (Parent et al., 2011).

### **1.6.3. Autres rôles des protéines WHIRLY chloroplastiques**

En plus de ce rôle bien caractérisé, les protéines WHIRLY chloroplastiques semblent également posséder divers rôles dans la cellule. Des études suggèrent qu'elles joueraient un rôle de facteur de transcription nucléaire. Ainsi, elles permettraient la transcription du gène nucléaire *PR10a* (Pathogenesis-Related 10a), et seraient donc impliquées dans les mécanismes de défense contre les pathogènes (Desveaux et al., 2000; Desveaux et al., 2004; Desveaux et al., 2005). Également, elles permettraient la répression transcriptionnelle du gène *KP1* (Kinesin Protein 1). La fonction de cette répression est toutefois inconnue.

Les protéines WHIRLY chloroplastiques semblent également impliquées dans le métabolisme de l'ARN. Une étude suggère en effet que la protéine WHY1 du maïs (unique protéine de la famille Whirly dans les chloroplastes chez *Zea mays*) jouerait un rôle non essentiel dans l'épissage de l'intron de type II de l'ARN *AtpF* (Prikryl et al., 2008). Les auteurs proposent également que la protéine WHY1 pourrait jouer un rôle dans la biogénèse des composants de la machinerie de traduction chloroplastique comme l'ARN ribosomique 23S, suggérant ainsi un rôle de cette protéine dans la biogénèse

chloroplastique (Prikryl et al., 2008). Finalement, bien que les auteurs éliminent la possibilité qu'un rôle de WHY1 dans la transcription puisse être à l'origine du défaut de biogénèse chloroplastique, les résultats de leur étude laissent planer le doute puisque l'abondance de plusieurs ARN messagers chloroplastiques semble varier dans les mutants *why1* (Prikryl et al., 2008).

Comme nous l'avons vu plus haut, les protéines WHY1 et WHY3 sont également retrouvées dans le PTAC, sous les noms respectifs de PTAC1 et PTAC11 (Pfalz et al., 2006). Leur rôle spécifique dans ce complexe transcriptionnel chloroplastique n'est toutefois pas encore compris à l'heure actuelle.

## **1.7. Projet de recherche**

Afin de mieux comprendre et caractériser le rôle des protéines WHIRLY dans le chloroplaste, le laboratoire avait, dans le passé, réalisé un criblage double-hybride en levure afin de trouver les interacteurs protéiques de la protéine WHY1. Ainsi, ils avaient fusionné la protéine WHY1 avec le domaine de fixation à l'ADN de la protéine GAL, puis l'avait exprimé dans une souche de levure. Par la suite, une banque de plasmides contenant des séquences codantes pour des protéines d'*Arabidopsis*, fusionnées avec la séquence codante pour le domaine de trans-activation de la protéine GAL, avait été utilisée afin de trouver les protéines d'*Arabidopsis* susceptibles d'interagir avec la protéine WHY1 et permettre la survie des levures. Parmi les protéines identifiées dans le criblage, la protéine SIG6 est ressortie deux fois (résultats non publiés). L'un des clones encodait une protéine SIG6 complète, fusionnée au domaine de trans-activation de la protéine GAL, tandis que l'autre encodait seulement la partie C-terminale de la protéine SIG6 fusionnée au domaine de trans-activation de la protéine GAL. Ces résultats semblaient donc indiquer qu'il existait une interaction protéique entre les deux protéines SIG6 et WHY1. Toutefois, ces résultats n'ont jamais été reconfirmés par des expériences indépendantes en présence de contrôles. Ce résultat était intéressant compte tenu du rôle de la protéine SIG6 dans la biogénèse chloroplastique (Loschelder et al., 2006), et du rôle supposé de la protéine WHY1 dans la biogénèse chloroplastique chez le maïs (Prikryl et al., 2008). De plus, le rôle de la protéine SIG6 dans la transcription chloroplastique (Ishizaki et al., 2005; Loschelder et al., 2006), ainsi que le fait que les protéines WHIRLY soient retrouvées dans le PTAC, la partie transcriptionnellement active du chromosome chloroplastique (Pfalz et al., 2006) venaient également faire le lien entre ces deux protéines.

À la lumière de ces considérations, l'objectif général de ce projet de recherche est donc de **vérifier l'implication des protéines chloroplastiques WHY1 et WHY3 dans la biogénèse chloroplastique chez la plante *Arabidopsis thaliana* en association avec la protéine SIG6.**

Pour cela, nous avons établi trois buts spécifiques :

- 1- Vérifier s'il existe une interaction génétique et/ou protéique entre les allèles *SIG6* et *WHY1* ainsi que *SIG6* et *WHY3*. Par l'intermédiaire de la caractérisation d'un mutant *sig6* et de croisements génétiques des mutants *why1*, *why3* et *why1why3* avec ce mutant, nous pourrions vérifier si les protéines WHY1 et WHY3 ont un impact sur le retard de biogénèse chloroplastique du mutant *sig6*. Également, une expérience de double-hybride en levure permettra de vérifier les résultats obtenus précédemment au laboratoire et de déterminer si la protéine SIG6 interagit avec les protéines WHY1 et/ou WHY3.
- 2- Vérifier l'impact des mutations *why1* et *why3* sur l'expression des protéines chloroplastiques ainsi que des gènes nucléaires photosynthétiques lors de la biogénèse chloroplastique dans un mutant *sig6*. Par l'intermédiaire d'immunobuvardage de type Western ou de RT-PCR semi-quantitative, nous pourrions évaluer l'impact de la suppression des protéines WHY1 et/ou WHY3 sur l'expression des protéines chloroplastique et des gènes nucléaires photosynthétiques chez une plante de type sauvage et un mutant *sig6*.
- 3- Comprendre le rôle des protéines WHIRLY dans la biogénèse chloroplastique en vérifiant le lien avec leur rôle dans le maintien de la stabilité génomique ou dans la transcription chloroplastique. La quantification de réarrangements génomiques chloroplastiques par PCR permettra de vérifier si les réarrangements causés par la perte des protéines WHIRLY peuvent avoir un impact sur le phénotype du mutant *sig6*. Également, un traitement à la rifampicine servira à évaluer l'impact d'une inhibition transcriptionnelle sur la biogénèse chloroplastique dans un mutant *sig6*.



# Matériel & Méthodes

## **2.1. Lignées mutantes utilisées**

Les lignées mutantes *sig6-3* (notée *sig6* dans le texte) (SAIL\_645\_F03) et *sig6-1* (SAIL\_893\_C09) (Ishizaki et al., 2005) dans *Arabidopsis* (*Arabidopsis thaliana*; écotype Columbia-0) ont été obtenues de l'Arabidopsis Biological Resource Center (ABRC). Les lignées *why1* (SALK\_099937), *why3* (Seattle TILLING Project; il68D8) et *why1why3* sont décrites dans Marechal et al., 2009.

## **2.2. Conditions de culture des plantes**

Les graines ont été stérilisées en surface et semées sur terre ou dans des boîtes de pétri contenant du milieu Murashige et Skoog (MS) (Sigma-Aldrich) (4.3 g/L sels de Murashige et Skoog, 0.5 g/L de MES pH 5.7) complété avec 1% de sucrose et 0.75% d'Agar. Après 3 jours à 4°C dans le noir, les graines sont transférées à une température de 22°C et disposées à la lumière ( $100 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ ; 16 h de lumière / 8h de noir par jour). Dans le cas d'un traitement à la rifampicine (UsBiological), celle-ci est ajoutée directement dans le milieu MS, autoclavé et refroidi jusqu'à environ 55°C, à une concentration finale de 25, 100, 500 ou 1000 mg/L.

## **2.3. Croisements, génotypage et identification de l'insertion T-DNA dans le mutant *sig6***

Pour le génotypage, les plantes sont cultivées pendant environ 15 jours sur terre. Une feuille de chacune des plantes est récoltée, puis l'ADN génomique total est extrait au CTAB (Cetyl trimethylammonium bromide) (Weigel and Glazebrook, 2002). Pour le génotypage des allèles *SIG6* et *WHY1*, une PCR avec des amorces spécifiques aux allèles sauvages ou mutantes est réalisée selon le programme suivant : 95 °C pendant 5 min; 35 cycles de 95 °C 30 s, 60 °C 30 s, 72 °C 45 s; 72 °C pendant 5 m. Pour l'allèle *SIG6*, les amorces 5'Sig6 et 3'Sig6 sont utilisées pour la réaction avec l'allèle sauvage, et l'amorce 3'Sig6 est couplée avec l'amorce LB pour la réaction avec l'allèle mutante. Les séquences sont présentées au Tableau I. Afin d'identifier le site d'insertion du T-DNA dans le gène

*SIG6*, le produit de PCR de la réaction mutante a été purifié sur gel, puis séquencé à la plateforme de génomique de l'IRIC.

Pour l'allèle *WHY1*, les amorces 5'Why1 et 3'Why1 sont utilisées pour la réaction sauvage, et l'amorce 5'Why1 est couplée avec l'amorce SALK-LB pour la réaction mutante. Pour le génotypage de l'allèle *WHY3*, la PCR est réalisée avec des amorces DCAPS (derived cleaved amplified polymorphic sequences) W138FOR et W138REV avec le programme suivant : 94 °C 2 min; 5 cycles de 94 °C 30 s, 52 °C 45 s et 72 °C 30 s; 5 cycles de 94 °C 30 s, 56 °C 45 s et 72 °C 30 s; 25 cycles de 94 °C 30 s, 60 °C 45 s et 72 °C 30 s; 72 °C 5 min (Maréchal et al., 2009). Le produit est ensuite digéré avec l'enzyme de restriction MvaI (Fermentas), migré sur un gel d'agarose 3%, puis détecté par coloration au GelRed (Biotium).

## **2.4. Microscopie confocale**

Les plantes de 4 jours sont montées entre des lames et lamelles puis observées avec un microscope confocal OLYMPUS FV300. L'excitation est réalisée avec un laser Argon à 488 nm. L'auto-fluorescence de la chlorophylle est détectée avec un filtre 660 nm LP.

## **2.5. Quantification de la chlorophylle *a* et *b***

Entre 10 et 20 mg de plantes sont récoltés, puis broyés pendant une minute dans un volume *V* de N,N-diméthylméthanamide (DMF) (environ 200 µL). L'homogénat est centrifugé durant 5 minutes à 14 000 RPM. L'absorbance du surnageant est mesurée à 646.8 nm et 663.8 nm en utilisant le DMF pour le blanc. La formule utilisée pour la quantification de la chlorophylle *a* et *b* est adaptée de (Porra et al., 1989):

$$Q_{chl\ a+b} = V \times \frac{17,67 \times A^{646.8} + 7.12 \times A^{663.8}}{m}$$

La quantité de chlorophylle *a* et *b* ( $Q_{Chl\ a+b}$ ) est exprimée en  $\text{mg.g}^{-1}$  (milligrammes de chlorophylle par gramme de plante), la masse de l'échantillon (*m*) en mg et le volume de DMF (*V*) en mL.

## **2.6. Extraction des acides nucléiques**

L'ADN génomique total a été extrait d'environ 100 mg de plantes à l'aide d'un protocole au CTAB (Cetyl trimethylammonium bromide) (Weigel and Glazebrook, 2002). L'ADN est ensuite conservé à -20 °C jusqu'à utilisation. L'ARN total est isolé à partir de 100 mg de plantes par la méthode d'extraction au TRIzol (Invitrogen) selon les instructions du fabricant. Le culot d'ARN obtenu est resuspendu dans 20  $\mu\text{L}$  d'eau traitée au DEPC (pyrocarbonate d'éthyle) afin d'éviter toute contamination à la RNase, puis conservé à -80 °C. Les ADNc sont synthétisés à l'aide du First-strand cDNA Synthesis Kit de Fermentas suivant les instructions du fabricant. Les ADNc sont ensuite conservés à -20 °C jusqu'à utilisation.

## **2.7. Extraction des protéines totales des plantes et Immuno-buvardage de type Western**

Les protéines sont extraites à l'aide d'une solution d'IPP (50 mM Tris-HCl pH 7.5, 150 mM NaCl, 1 % NP-40, 0.5 % sodium deoxycholate et 1 tablette de *Complete* Protease Inhibitor (Roche)). Entre 30 et 60 mg de plantes sont récoltés et immédiatement congelés dans l'azote liquide. Les échantillons sont ensuite broyés dans 300  $\mu\text{L}$  de solution d'IPP, puis centrifugés pendant 5 minutes à 14 000 RPM. Le surnageant est récupéré et conservé à 4 °C jusqu'à utilisation. Les extraits protéiques sont ensuite quantifiés en utilisant le BCA Protein Assay Kit de ThermoScientific-Pierce, en suivant les instructions du fabricant.

Pour l'immuno-buvardage de type Western, 20  $\mu\text{g}$  de protéines totales sont mélangés avec un tampon de Laemmli 3 X (240 mM Tris-Cl pH 6.8, 6 % SDS, 30 % glycérol, 15 %  $\beta$ -mercaptoethanol, 0.06 % Bleu de Bromophenol) et chauffées 5 minutes à 100 °C.

Les échantillons sont chargés sur un gel SDS-PAGE à 9 % et mis à migrer à 150 V pendant environ 1h dans un tampon de migration (3.03 g/L Base Tris, 14.4 g/L Glycine, 1 g/L SDS). Les protéines sont ensuite transférées sur une membrane de nitrocellulose Hybond ECL Amersham (GE Healthcare) à 100 mA pendant 1 h, à l'aide d'un appareil de transfert semi-sec (Bio-Rad), et d'un tampon de transfert (3.03 g/L Base Tris, 14.4 g/L Glycine, 20 % Methanol). Les membranes sont bloquées avec une solution de 5 % de lait écrémé, puis incubées une nuit entière à 4 °C avec les anticorps primaires dans 3 % BSA (Bovine Serum Albumine) selon les concentrations suivantes :  $\alpha$ -RBCL (1:10 000) (polyclonal, N°R4404, Sigma-Aldrich),  $\alpha$ -PSBA (1:10 000) (polyclonal, N°AS05084, Agrisera),  $\alpha$ -PSAA (1:1000) (polyclonal, N°AS06172, Agrisera),  $\alpha$ -ATPB (1:4000) (polyclonal, N°AS05085, Agrisera) et  $\alpha$ -PSAB (1:1000) (polyclonal, N°AS06166A, Agrisera). Les membranes sont finalement incubées avec les anticorps secondaires dans 3 % de lait écrémé à température pièce pendant 1 h, avec un anticorps dirigé contre les IgG de poulet (1:10 000) dans le cas d' $\alpha$ -RBCL ou un anticorps dirigé contre les IgG de lapin (1:10 000) pour les autres anticorps primaires. La détection est réalisée à l'aide de l'ECL Advance Western Blotting Detection Kit de GE Healthcare, selon les instructions du fabricant. Finalement, les bandes sont révélées sur films autoradiographiques Hyblot Cl™ (Denville Scientific Inc.) ou quantifiées à l'aide du ChemiDoc™ MP System (Bio-Rad) et du logiciel ImageLab. Un gel est également coloré au Bleu de Coomassie afin d'être utilisé comme contrôle d'équilibration.

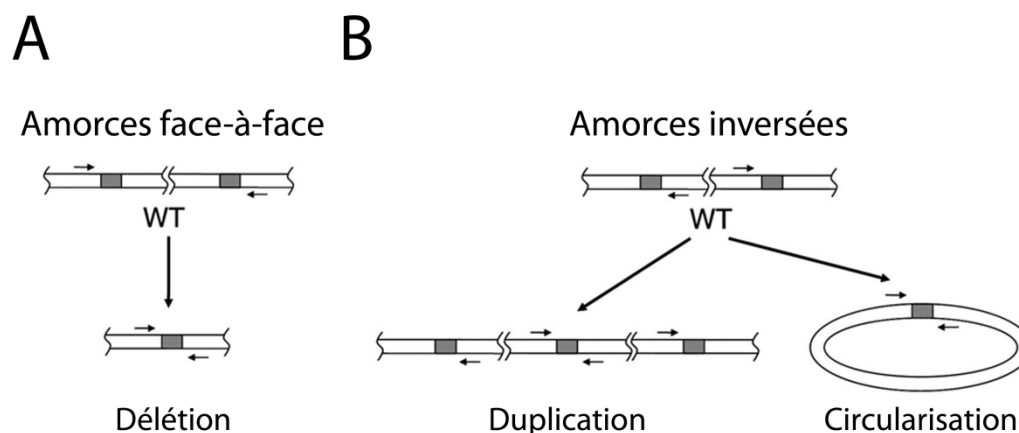
## **2.8. RT-PCR semi-quantitative**

Les expériences de RT-PCR semi-quantitatives ont été réalisées sur des ADNc synthétisés à partir d'ARN total extrait de plantes à 4 jours. Le programme de PCR utilisé est le suivant : 95 °C 2 min; X cycles de 95 °C 30 s, 60 °C 30 s et 72 °C 30 s; 72 °C 5 min. Le nombre de cycles utilisés (X) a été de 24 pour les gènes de la  *$\beta$ -TUBULINE*, *LHCB1.2* et *SIG6* ou 18, 35 et 26 respectivement pour les gènes *RBCS1A*, *LHCB2.2* et *LHCB2.4*. Afin de discriminer entre l'amplification de l'ADNc et de l'ADN génomique, en cas de contamination de ce dernier dans les échantillons, les amorces ont été choisies de chaque

côté d'un intron suffisamment grand dans le gène. Les amorces utilisées sont présentées au Tableau I. L'amplification de la  *$\beta$ -Tubuline* a été utilisée pour équilibrer la quantité d'ADNc utilisée pour l'amplification des gènes.

## **2.9. Détection des réarrangements dans le génome chloroplastique**

L'ADN génomique total est extrait au CTAB d'environ 100 mg de plantes à 21 jours. La quantité d'ADN chloroplastique est équilibrée dans les extraits avec une PCR d'amplification de l'ADN du gène chloroplastique *YCF2*. La technique de détection des réarrangements ainsi que les amorces utilisées ont été précédemment décrites (Cappadocia et al., 2010). Brièvement, l'approche de PCR utilise des amorces face-à-face ou inversées, et espacées en moyenne d'une dizaine de kilobases. Les événements de délétion permettent le rapprochement des amorces face-à-face et donc l'amplification d'un produit (Figure 4A). Également, un événement de duplication ou de circularisation donne la possibilité d'amplifier un produit avec les amorces inversées (Figure 4B). Les produits de PCR obtenus sont ensuite migrés sur gel d'agarose 1 %. Les réactions sont réalisées en duplicata pour chacune des lignées présentées. Les quatre réactions présentées sont représentatives des huit paires d'amorces testées (Tableau I).



**Figure 4 : Stratégie de PCR utilisée pour détecter les réarrangements dans le génome chloroplastique. (A)** Des amorces face-à-face et séparées d'en moyenne 10kb sont utilisées pour détecter les délétions dans le génome. **(B)** Des amorces inversées sont utilisées pour détecter les duplications ou les circularisations. Les flèches représentent les amorces. Les portions grises sur l'ADN représentent des micro-homologies. Les explications sur la production des réarrangements par les microhomologies sont données dans Maréchal et al., 2009. (Figure traduite et tirée de (Cappadocia et al., 2010)).

## **2.10. Constructions des plasmides pour le Double-Hybride**

Les inserts correspondants aux séquences codantes, privées des peptides de transit chloroplastique, des gènes *SIG6*, *WHY1* et *WHY3* ont été amplifiés grâce aux amorces fournies au Tableau I sur les ADNc d'une plante de type sauvage. Ces amorces ajoutent un site de restriction pour l'enzyme de restriction NdeI en amont de la séquence codante, en plus d'un Strep-Tag dans le cas de *SIG6*, ou un site de restriction pour l'enzyme de restriction BamHI en aval. Les inserts ainsi que les plasmides pGBKT7 et pGADT7 (ClonTech) sont ensuite digérés avec NdeI et BamHI (Fermentas), purifiés sur gel d'agarose 1 %, puis extraits du gel. Les plasmides sont également déphosphorylés en 5' avec la FastAP (Fermentas) pour éviter une recircularisation. Une réaction de ligation avec un rapport insert:plasmide de 3:1 est réalisée avec la T4 DNA Ligase (Fermentas). Trente ng de plasmide sont transformés dans des bactéries *Escherichia coli* compétentes de lignée *DH5α*, puis cultivées à 37 °C toute une nuit sur des boîtes de pétri contenant du milieu LB (Lysogeny Broth) (10 g/L tryptone, 5 g/L extrait de levures, 10 g/L NaCl, pH 7.5) complété

avec 1.5 % d'agar (BioShop) et 100 mg/L d'ampicilline (BioShop) dans le cas des cultures contenant le plasmide pGADT7 ou 50 mg/L de Kanamycine (Sigma) dans le cas des cultures contenant le plasmide pGBKT7. Les constructions sont ensuite extraites de cultures bactériennes liquides à l'aide d'une trousse d'isolation de plasmides (Feldan).

### **2.11. Expérience de Double-Hybride en levure**

Le protocole utilisé pour la transformation de levure est décrit dans le Yeast Protocols Handbook (ClonTech). Brièvement, 0.1 µg de chacune des constructions est transformé, en présence de 0.1 mg d'ADN de sperme de hareng, dans une souche de levure *pJ-69-4a* (gracieusement fournie par le laboratoire du Dr. Pascal Chartrand). La souche, de génotype MATa *trp1-901 leu2-3,112 ura3-52 his3-200 gal4* (supprimé) *gal80* (supprimé) *LYS2::GAL1-HIS3 GAL2-ADE2 met2::GAL7-lacZ*, est mutante pour les gènes permettant la synthèse de Leucine, Tryptophane et des protéines GAL4 et 80. Les gènes permettant la synthèse de l'Adénine et de l'Histidine sont sous le contrôle d'un promoteur dépendant de la protéine GAL. La souche est rendue compétente grâce à l'acétate de lithium (LiAc). Les levures transformées sont ensuite cultivées sur un milieu SD (Synthetic Drop-out) minimal sans Leucine (sélection pour pGADT7) et sans Tryptophane (sélection pour pGBKT7). La recette suivante est utilisée : 6.7 g/L base Azotée pour levure (Difco), 2 g/L Synthetic Drop-Out -Leu-Trp (BioShop) ou 0.6 g/L SD-Leu-Trp-His-Ade (ClonTech), pH 5.8, complétée avec 20 g/L d'Agar Bactériologique avant l'autoclave et 50 mL/L d'une solution de glucose à 40 % (concentration finale de 2 %) après refroidissement. Les boîtes de pétri sont incubées pendant 3 jours à 30 °C. Par la suite, une colonie de chacune des souches est striée sur un milieu minimal sans Leucine, Tryptophane, Histidine et Adénine. Les boîtes de pétri sont ensuite incubées pendant 4 jours à 30 °C. Les plasmides codant pour la protéine WHY1 fusionnée au domaine de liaison à l'ADN (pGBK-WHY1) ainsi qu'au domaine de trans-activation (pGAD-WHY1) sont co-transformés et utilisés comme contrôles positifs étant donné que la protéine WHY1 est capable d'homo-tétramérisation



(Cappadocia et al., 2010; Cappadocia et al., 2012). Deux expériences indépendantes ont été réalisées.

### **2.12. Extraction de protéines totales des levures et Immuno-Buvardage de type Western**

Une colonie de levure transformée est repiquée et suspendue dans un milieu de culture liquide minimal sans Leucine et sans Tryptophane et laissée à pousser pendant 2 jours à 30 °C. 1.5 mL de milieu est prélevé et les cellules sont récoltées par centrifugation à 14 000 RPM pendant 15 secondes. Après avoir enlevé le surnageant, les cellules sont lavées 2 fois en les resuspendant dans 1 mL d'eau, puis en les centrifugeant. Finalement, le culot de cellules est resuspendu dans du Laemmli 1 X, puis chauffé 10 minutes à 98 °C. La solution est chargée sur un gel SDS-PAGE à 12 %. Le protocole est ensuite le même que celui pour l'immuno-buvardage de type Western des protéines de plantes. Les anticorps primaires et secondaires utilisés sont les suivants :  $\alpha$ -Strep (1:10 000) (monoclonal, 27471001, GE Healthcare) dans 1 % BSA pour la protéine SIG6 et détection à l'aide d'un anticorps dirigé contre les IgG de souris (1:10 000);  $\alpha$ -WHIRLY (1:4000) dans 3 % BSA pour les protéines WHY1 et WHY3 et détection à l'aide d'un anticorps dirigé contre les IgG de lapin (1:10 000).

**Tableau I : Liste des amorces utilisées dans l'étude.**

Gène	Nom de l'amorce	Séquence (5' vers 3')
<u>Amorces utilisées pour le génotypage</u>		
<b>SIG6</b>	5'Sig6 3'Sig6	CGGGAAGAGTCTAGGCCTCTG CGTCTCTCTAGCTGCCGCTTCG
<b>WHY1</b>	5'Why1 3'Why1	GGCCAATCGTTGGTCCTAAAATCG TGACCCACGTAAAATCTAGCAGGC
<b>WHY3</b>	W138FOR W138REV	CAGCTGGTGTTCGTCAATATGCCTG GCCCAAGGCTAACTAGATTACCGAT
<b>T-DNA</b>	LB SALK-LB	CTTCCACACGTGGATCCATGA ATTTTGCCGATTTCGGAAC
<u>Amorces utilisées pour la RT-PCR semi-quantitative</u>		
<b>SIG6</b>	5'Sig6-RT 3'Sig6-RT	AGCTCTTCTATGTCCTTACCGG GCTTCTCCACGGTGGATA
<b>LHCB1.2</b>	5'Lhcb1.2-RT 3'Lhcb1.2-RT	GTGTGACAATGAGGAAGACTGTTGCC AAATGCTCTGAGCGTGGACCAAGCTA
<b>LHCB2.2</b>	5'Lhcb2.2-qRT 3'Lhcb2.2-qRT	CGGTTCTTAGCGAATGTCTCC GACCTCATCCAAAAGGTGGG
<b>LHCB2.4</b>	5'Lhcb2.4-qRT 3'Lhcb2.4-qRT	TGGCCAAACGACCCTAAAGC GTCCCAACCGTAGTCTCCAG
<b>RBCS1A</b>	5'Rbcs1A-qRT 3'Rbcs1A-qRT	AATTTCGGACTTAACGTTTGTTT CATCAGACAGTTGAGAATCCGATAGA
<b>B-TUBULINE</b>	5'Tubu-qRT 3'Tubu-qRT	CCTTCTCGGTGTTCCCTTCACC GGGAACCTCAGACAGCAAGTCAC
<u>Amorces utilisées pour le clonage en double-hybride</u> (le site de restriction inséré est indiqué en gras et le Strep-Tag est souligné en rouge)		
<b>SIG6</b>	5-Sig6-woTP-NdeI 3-Sig6-woTP-BamHI	ATAC <b>ATATG</b> <u>TGGTCTCATCCTCAATTGAAAA</u> AGCGTCGGTTCTCTCACAG ATAG <b>GATCC</b> CTAGACAAGCAAATCAGCATAAGCA

<b>WHY1</b>	5-Why1-woTP-NdeI 3-Why1-woTP- BamHI	ATACATATGGCTGAAGGATTGCCTGCTAG ATAGGATCCTCATCTATTCCATTCATAGTCTCCTCC
<b>WHY3</b>	5-Why3-woTP-NdeI 3-Why3-woTP- BamHI	TGACATATGGCTGAAGTATCTTCTCCTAGATTTACG ATAGGATCCTCATCTACTCCATTCGTAGTCTCC
<u>Amorces utilisées pour la détection des réarrangements génomiques chloroplastiques</u>		
<b>YCF2</b>	ycf2REV ycf2FOR	TGTTTCGCCTCTTACTCGGAG GATCTCTGAGAGCTGTTTCCG
<b>Réaction 1</b>	31138REV 20481FOR	AATAGCCTAGCGCATCGAACG GCGTTGATCTAATTGCCACCG
<b>Réaction 2</b>	40130REV 50251FOR	GGGAAGAGGAGGAACATGTCA GGCCCCTTCCTAATTGGAGAT
<b>Réaction 3</b>	84761REV 95260FOR	CCTTAGGCACGGCCATACATA AACCTGCTAGTGGAGGAAGAC
<b>Réaction 4</b>	105961REV 116007FOR	GCGTTACTCAAGCCGACATTC AAACCACTCATGCCCGGCAAT
<b>Réaction 5</b>	69633REV 59291FOR	GAGGAACATGTACTCGGGTGT AGGCCTAGTCTTTCCGGGAAT
<b>Réaction 6</b>	111330REV 121141FOR	TCAACAGCGGGATTAACCGCA AACGTCATCCGGTTACCGGTT
<b>Réaction 8</b>	68821REV 79920FOR	ACGCGGATATATAGCTCGGAG CCATGCCGTTCCGGAAGTGATT
<b>Réaction 9</b>	10501REV 30511FOR	TGACTGCCTTACCAATCGTCG GCTGCCTCCTTGAAAGAGAGA

# Résultats

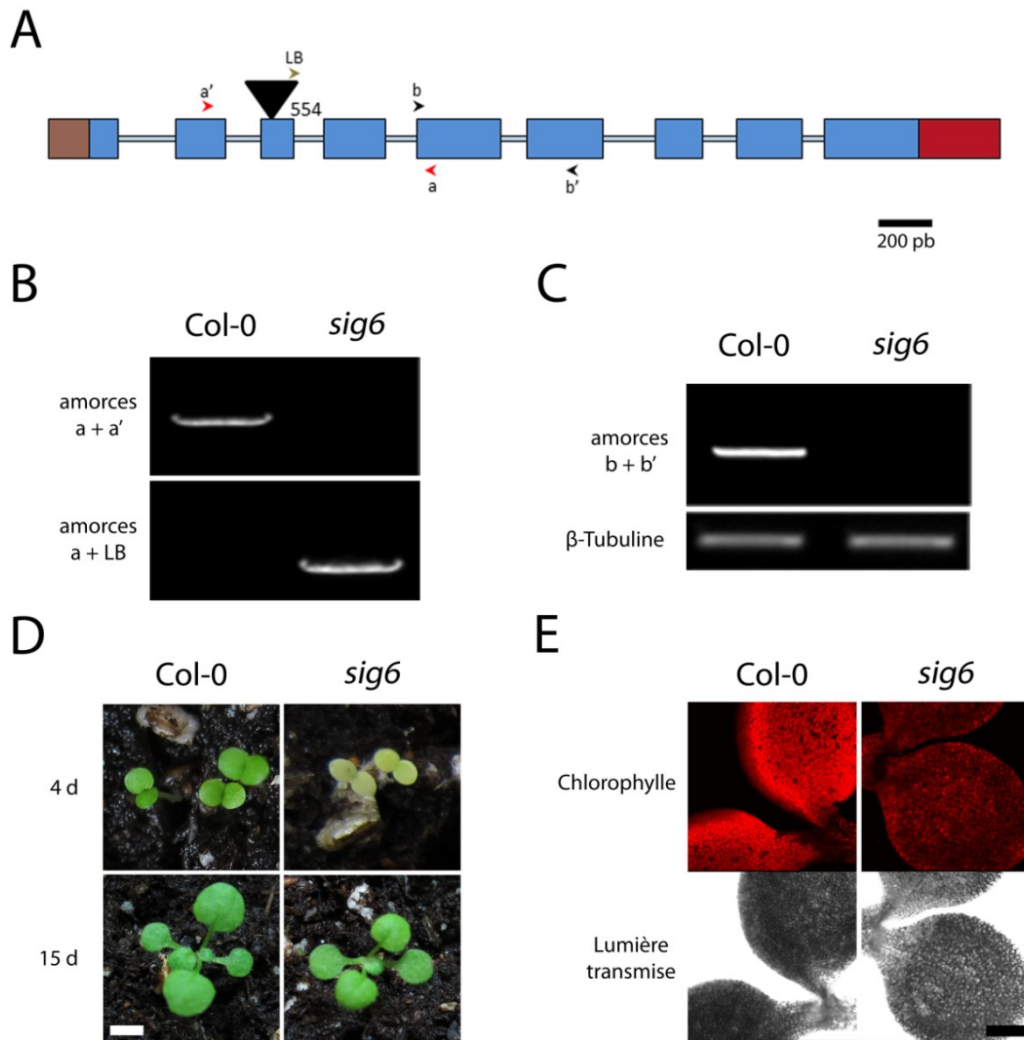
### **3.1. Caractérisation d'une nouvelle lignée sig6 mutante pour le facteur sigma 6.**

Afin de comprendre l'impact de l'absence de la protéine SIG6 sur le phénotype de la plante *Arabidopsis thaliana*, nous avons à notre disposition un mutant d'insertion *sig6* (SAIL\_645\_F03) provenant de l'Arabidopsis Biological Resource Center (ABRC). Ce mutant d'insertion a été généré par transformation d'une plante mère à l'aide d'*Agrobacterium tumefaciens*, permettant d'insérer un fragment d'ADN du plasmide Ti (T-DNA) dans le génome végétal et notamment dans les cellules germinales. Ainsi, les plantes de la seconde génération présente une mutation dans le gène dans lequel l'insertion du T-DNA s'est produite. La lignée mutante SAIL\_646\_F03 n'ayant pas encore fait l'objet d'une publication, il nous fallait donc la caractériser afin de vérifier si elle correspondait aux phénotypes habituellement observés chez les mutants *sig6*. Nous avons nommé ce mutant *sig6-3* puisqu'il s'agit du troisième mutant *sig6* identifié.

Le gène *SIG6* se compose de 9 exons séparés par 8 introns (Figure 5A). Afin d'obtenir un mutant homozygote *sig6-3*, nous avons effectué le génotypage de la descendance d'un hétérozygote *sig6-3*. Pour cela, des amorces de part et d'autre du site prédit d'insertion du T-DNA ont été utilisées dans une réaction PCR. Une plante homozygote mutante a pu ainsi être isolée (Figure 5B). Afin de vérifier le site exact d'insertion du T-DNA, nous avons fait séquencer le produit de la réaction mutante. L'insertion se situe dans le 3<sup>ème</sup> exon du gène *SIG6*, le côté gauche de l'insertion étant adjacent au 554<sup>ème</sup> nucléotide suivant le codon ATG de départ du gène (Figure 5A). Étant donné la présence du T-DNA directement dans la séquence codante pour la protéine SIG6, nous avons voulu vérifier si cette insertion provoquait bien l'absence d'expression du gène *SIG6*. Pour cela, une RT-PCR semi-quantitative a été réalisée en utilisant des amorces situées après le site d'insertion. On constate que l'ARN du gène *SIG6* est absent puisqu'aucun produit n'est amplifié chez le mutant *sig6-3* (Figure 5C). Cela suggère donc l'absence totale d'expression de *SIG6* dans les mutants *sig6-3*.

Dans des études précédentes, il a été montré que les mutants *sig6-1* et *sig6-2* présentent un phénotype de cotylédons pâles à 4 jours (Ishizaki et al., 2005; Loschelder et al., 2006). Afin de vérifier si la nouvelle lignée utilisée ici présente également ce phénotype, nous avons planté les mutants sur terre. On remarque qu'à 4 jours, la plante présente deux cotylédons pâles comparativement à une plante de type sauvage Col-0 (Figure 5D). Ce phénotype est limité aux cotylédons puisque les premières vraies feuilles n'ont ensuite aucune différence comparativement à la plante de type sauvage, comme le montre une photo prise à 15 jours (Figure 5D). Afin de vérifier si cette pâleur s'accompagne d'une diminution de la chlorophylle dans les chloroplastes, nous avons observé les plantes à l'aide d'un microscope permettant de visualiser l'auto-fluorescence des chloroplastes. L'excitation se fait à l'aide d'un laser Argon à 488 nm et la visualisation, à l'aide d'un filtre 650 nm LP, ce qui permet d'observer l'auto-fluorescence émise par la chlorophylle. On remarque que l'auto-fluorescence détectée chez le mutant *sig6-3* est très faible comparativement au signal observé chez la plante sauvage (Figure 5E). Ainsi, on en déduit que le mutant *sig6-3* présente un manque de chlorophylle dès les premiers stades de croissance qui, compte tenu du phénotype, semble se résorber par la suite.

En conclusion, nous avons montré ici que le mutant *sig6-3*, que nous noterons *sig6* dans le texte, est bien privé de l'expression du gène *SIG6*. Il présente également le phénotype typique des mutants *sig6-1* et *sig6-2* soit les cotylédons pâles à 4 jours, caractéristique d'un retard de biogénèse chloroplastique (Ishizaki et al., 2005; Loschelder et al., 2006).



**Figure 5: Caractérisation d'une nouvelle lignée *sig6* mutante pour le facteur sigma 6.** (A) Représentation schématique du gène *Sig6*. Les exons sont représentés par des carrés bleus et les introns par des lignes bleues pâles. Les carrés brun et rouge représentent respectivement les régions non-traduites en 5' et en 3'. L'insertion T-DNA dans l'exon 3 est représentée par un triangle noir. Le côté gauche du T-DNA est noté LB. L'insertion se situe dans le 3ème exon du gène *SIG6*, le côté gauche de l'insertion étant adjacent au 554ème nucléotide suivant le codon ATG de départ du gène. Les têtes de flèches noires (b et b') représentent les amorces utilisées pour la RT-PCR semi-quantitative et les têtes de flèches rouges (a et a') et vertes (LB) représentent les amorces utilisées pour le génotypage. La barre noire représente une longueur de 200 paires de bases. (B) Génotypage de la lignée *sig6*. La réaction de PCR pour le génotypage du gène a été effectuée avec les amorces pour la réaction sauvage (amorces a + a') et la réaction mutante (amorces a + LB). (C) RT-PCR semi-quantitative pour l'expression du gène *Sig6*. La réaction de PCR est effectuée sur des ADNc avec les amorces b et b'. L'expression du gène de la  $\beta$ -TUBULINE est utilisée comme contrôle d'équilibrage du niveau d'ARN total. (D) Phénotype à 4 et 15 jours de Col-0 et *sig6*. La barre blanche représente une taille d'environ 2 mm. (E) Auto-luminescence de la chlorophylle chez Col-0 et *sig6*. La barre noire représente une taille d'environ 250  $\mu$ m.

### **3.2. Croisement du mutant *why1why3* avec le mutant *sig6*.**

Afin d'obtenir des mutants possédant la mutation *sig6* associée aux mutations *why1* et/ou *why3*, nous avons effectué un croisement entre les lignées mutantes *why1why3* et *sig6*. Celui-ci est réalisé manuellement entre les deux mutants, puis les graines triples-hétérozygotes obtenues sont plantées pour permettre l'autofécondation. La descendance est replantée afin d'effectuer un génotypage. Pour cela, l'ADN des plantes obtenues est extrait puis, pour les gènes *SIG6* et *WHY1*, une réaction de PCR est réalisée avec des amorces permettant l'amplification de l'allèle sauvage ou des amorces permettant l'amplification de l'allèle mutante.

Pour le gène *SIG6*, on remarque que, chez les plantes Col-0 et *why1why3*, seules les amorces pour l'allèle sauvage permettent d'amplifier un produit (5'Sig6 + 3'Sig6) (Figure 6A). Cela signifie que ces plantes ne sont pas mutantes pour le gène *SIG6*. Par contre, chez les plantes *sig6*, *sig6why3*, *sig6why1* (numéros 34 et 36) et *sig6why1why3* (numéros 6, 26 et 41), seules les amorces permettant d'amplifier l'allèle mutante conduisent à l'obtention d'un produit (LB + 3'Sig6) (Figure 6A). On en conclut donc que ces dernières sont des mutantes homozygotes pour le gène *SIG6*.

De la même manière, pour le gène *WHY1*, on remarque que, chez les plantes Col-0, *sig6* et *sig6why3*, seules les amorces pour la réaction sauvage permettent d'amplifier un produit (5'Why1 + 3'Why1) (Figure 6B). Cela signifie que ces plantes ne sont pas mutantes pour le gène *WHY1*. Par contre, chez les plantes *why1why3*, *sig6why1* (numéros 34 et 36) et *sig6why1why3* (numéros 6, 26 et 41), seules les amorces de la réaction mutante permettent d'amplifier un produit (5'Why1 + SALK LB) (Figure 6B). On en déduit que *sig6why1* et *sig6why1why3* sont des mutantes homozygotes pour le gène *WHY1*.

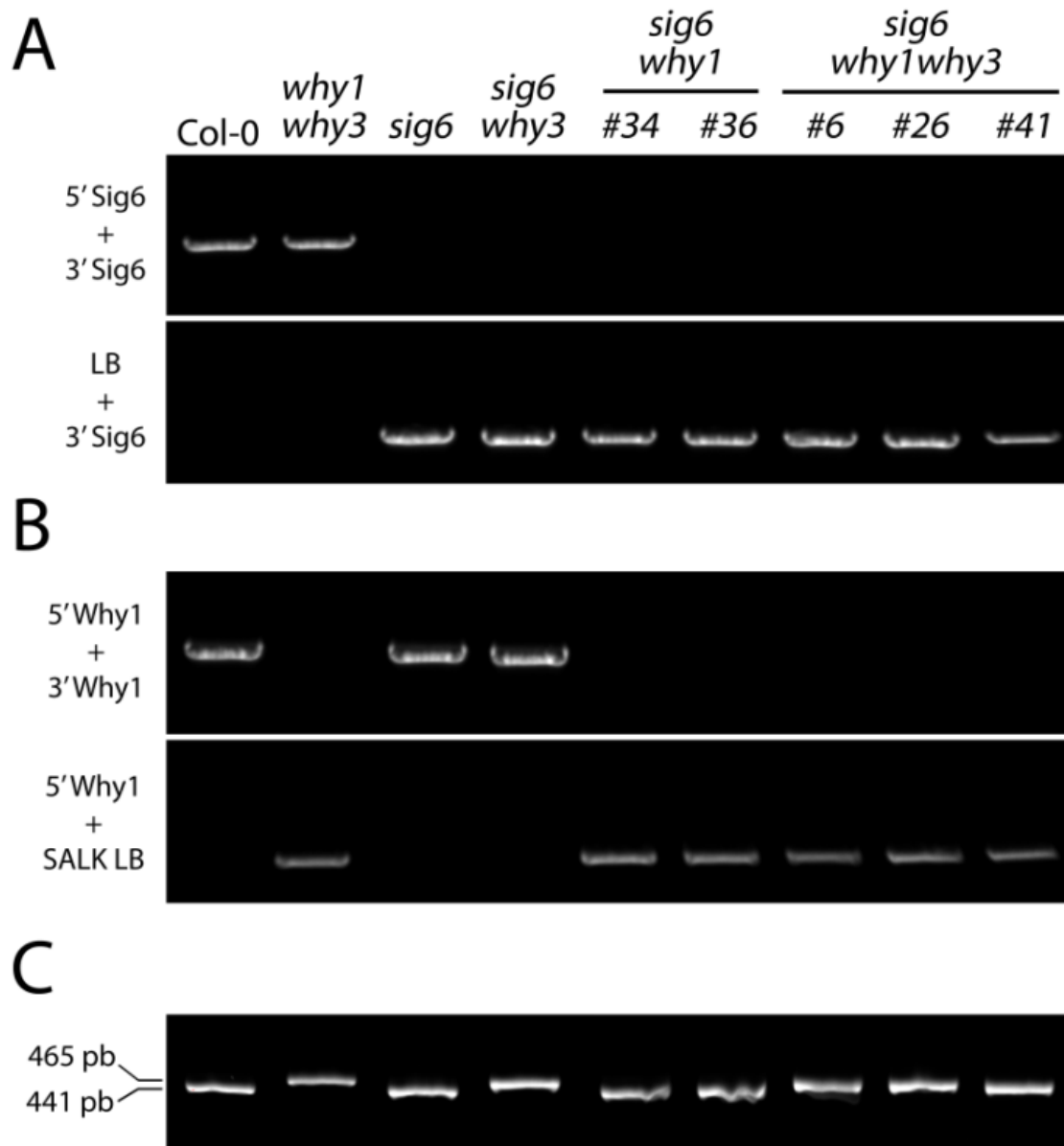
Pour le gène *WHY3*, des amorces DCAPS (Derived Cleaved Amplified Polymorphic Sequences) sont utilisées afin de vérifier si la mutation ponctuelle, abolissant l'expression de *WHY3*, est présente. Un produit est amplifié à l'aide de ces amorces, puis digéré par l'enzyme de restriction MvaI. La mutation ponctuelle du mutant *why3* permet en effet



d'abolir un site de restriction MvaI présent dans le gène *WHY3*. Dans le cas où la mutation est présente, le produit n'est pas digéré, tandis que si elle est absente, il l'est. Dans le cas d'un hétérozygote, les deux produits digérés et non digérés sont présents. C'est donc la taille des produits obtenus après digestion qui nous permet de conclure sur la présence de la mutation du gène *WHY3*.

On remarque que, chez les plantes Col-0, *sig6* et *sig6why1* (numéros 34 et 36), les amorces DCAPS permettent l'amplification d'un produit qui peut être digéré (Figure 6C). Ceci nous indique donc qu'elles ne présentent pas la mutation du gène *WHY3*. Par contre, chez les plantes *why1why3*, *sig6why3* et *sig6why1why3* (numéros 6, 26 et 41), ces amorces permettent l'amplification d'un produit qui ne peut être digéré par MvaI (Figure 6C). On en conclut que ces dernières sont homozygotes mutantes pour le gène *WHY3*.

À la lumière de ces résultats, on peut conclure que la plante *sig6why3* est double homozygote mutante pour les gènes *SIG6* et *WHY3*, que les plantes *sig6why1* (numéros 34 et 36) sont doubles homozygotes mutantes pour les gènes *SIG6* et *WHY1* et que les plantes *sig6why1why3* (numéros 6, 26 et 41) sont triples homozygotes pour les gènes *SIG6*, *WHY1* et *WHY3*.



**Figure 6 : Croisement du mutant *sig6* avec une lignée *why1why3*.** **(A)** Génotypage de l'allèle *Sig6*. Les amorces 5' *Sig6* et 3' *Sig6* sont utilisées pour la réaction de type sauvage. L'amorce LB représente l'amorce se fixant au côté gauche du T-DNA de type SAIL et est couplée avec l'amorce 3' *Sig6* pour la réaction de type mutante. **(B)** Génotypage de l'allèle *Why1*. Les amorces 5' *Why1* et 3' *Why1* sont utilisées pour la réaction de type sauvage. L'amorce SALK LB représente l'amorce se fixant au côté gauche du T-DNA de type SALK et est couplée avec l'amorce 5' *Why1* pour la réaction de type mutante. **(C)** Génotypage de l'allèle *Why3*. Le produit de PCR est digéré avec l'enzyme *Mva*I, supprimant 24 paires de bases au produit dans le cas d'une absence de mutation *why3*. L'ordre présenté à la figure A est le même pour les figures B et C. Les # représentent des numéros de lignées isolées séparément.

### **3.3. L'absence d'un des deux Whirly complémente l'apparition du phénotype du mutant *sig6*.**

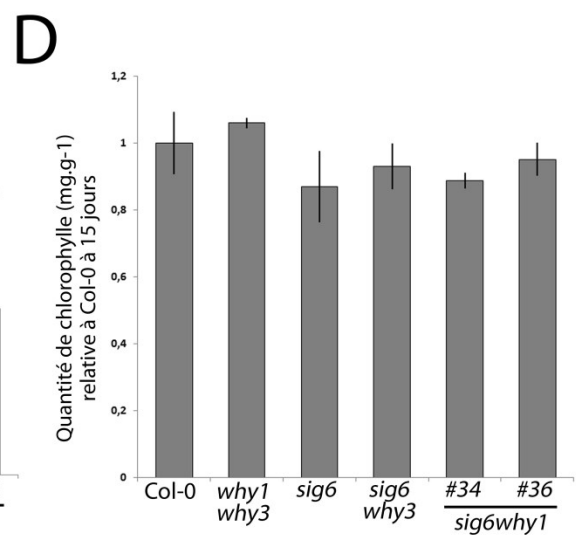
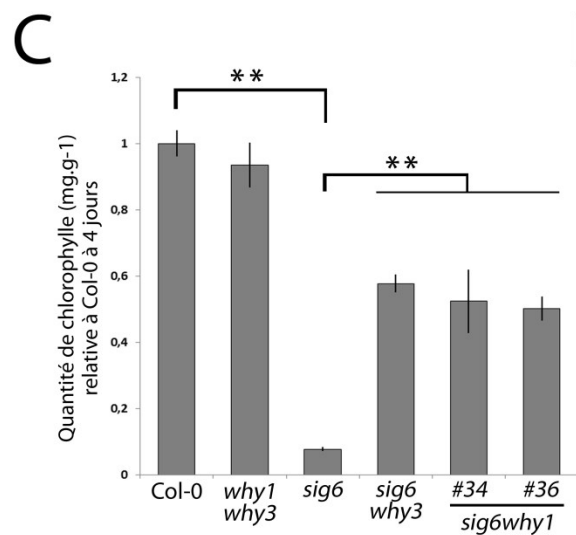
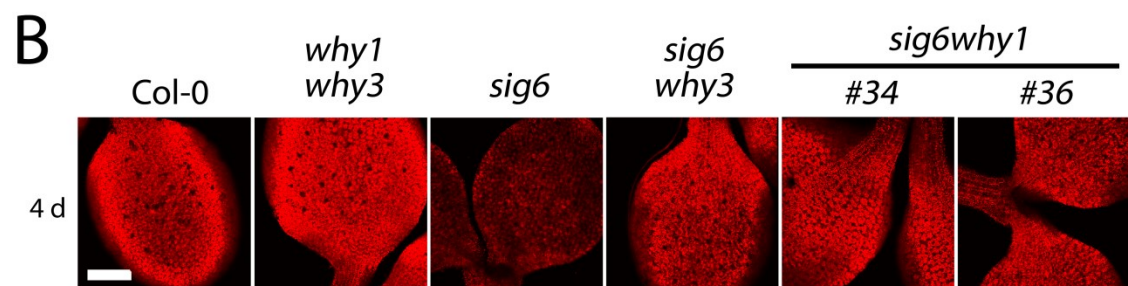
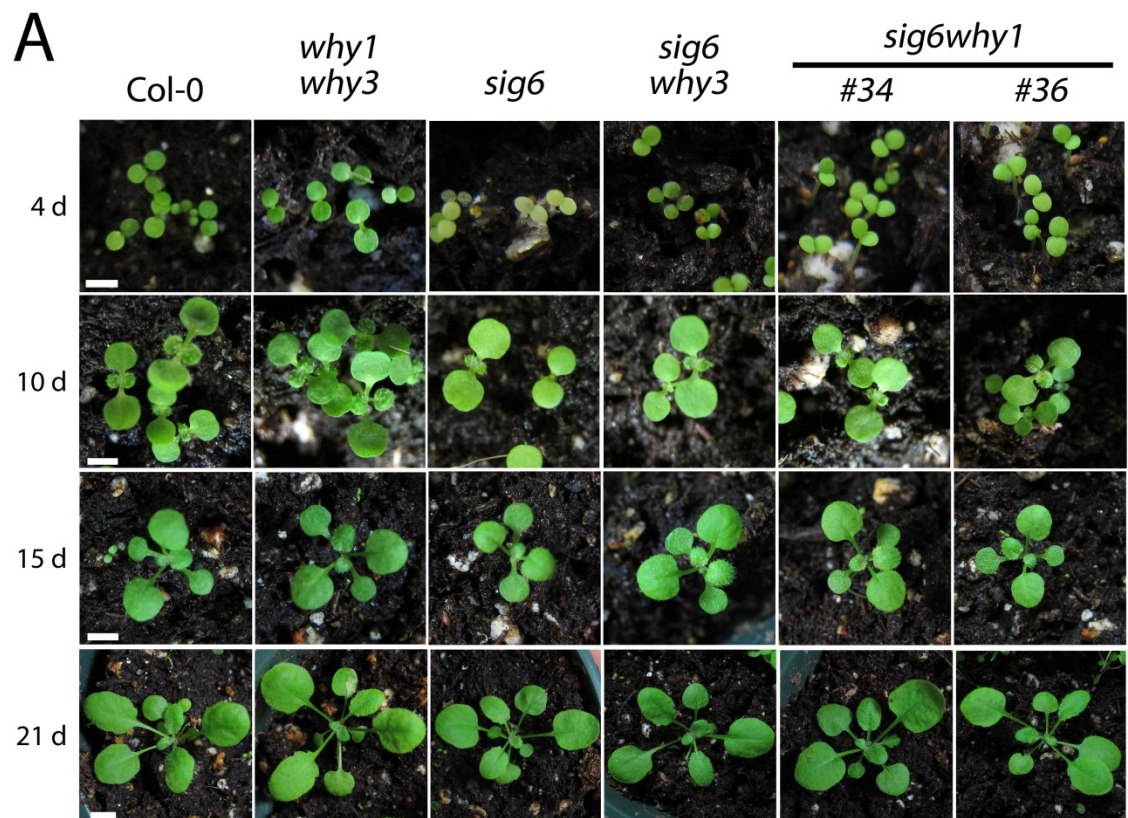
Afin de vérifier si les protéines WHY1 et WHY3 jouent un rôle dans la biogénèse chloroplastique en association avec le facteur SIG6, les doubles mutants *sig6why3* et *sig6why1* isolés ont ensuite été semés sur terre. Des photos sont présentées à 4, 10, 15 et 21 jours (Figure 7A). On remarque, à 4 jours, que le mutant *sig6* présente le phénotype de cotylédons pâles tandis que les doubles mutants *sig6why3* et *sig6why1* semblent perdre ce phénotype et être similaires à la plante de type sauvage Col-0 (Figure 7A). Ces doubles mutants ne possèdent aucun phénotype particulier après 10 jours de développement, tout comme le mutant *sig6*. Afin de vérifier si la perte du phénotype de *sig6* chez les doubles mutants est corrélée à l'augmentation de la quantité de chlorophylle dans les chloroplastes, nous avons observé les plantes à l'aide d'un microscope confocale. On observe que l'auto-fluorescence semble être restaurée dans les doubles mutants comparativement au mutant *sig6* (Figure 7B). Par contre, l'intensité du signal semble moins forte que chez les plantes de type sauvage Col-0.

Afin de vérifier s'il y a réellement une complémentation du phénotype chez les doubles mutants, nous avons quantifié précisément la chlorophylle *a* et *b* dans les plantes. Une extraction de la chlorophylle sur environ 10 à 15 mg de plantes a été réalisée puis l'absorbance mesurée à 646.8 nm et 663.8 nm. On constate qu'à 4 jours, le simple mutant *sig6* présente environ 10 fois moins de chlorophylle *a* et *b* que la plante de type sauvage (Figure 7C). Le double mutant *sig6why3* retrouve presque 60% du contenu normal en chlorophylle. Les doubles mutants *sig6why1*, quant à eux, présentent également une ré-augmentation de la quantité de chlorophylle à plus de 50% du niveau normal (Figure 7C). Ces différences sont statistiquement significatives avec un risque d'erreur de 1%. Après 15 jours, la quantité de chlorophylle ne présente plus de différences significatives entre les différents mutants et la plante de type sauvage (Figure 7D).

En conclusion, il existe une interaction génétique entre les allèles *SIG6* et *WHY1* ainsi qu'entre les allèles *SIG6* et *WHY3*. On remarque ainsi que l'absence d'une des deux protéines WHIRLY dans un mutant *sig6* favorise le retour à la normale du phénotype de *sig6*. Cette complémentation n'est cependant que partielle puisque la quantité de chlorophylle des doubles mutants *sig6why1* et *sig6why3* augmente d'environ 5 fois comparativement au mutant *sig6* mais ne parvient pas à atteindre le niveau de la plante sauvage.

---

**Figure 7 (page suivante) : Les mutations *why1* ou *why3* complémentent fortement le phénotype du mutant *sig6*.** (A) Photos des phénotypes de Col-0 et des mutants *why1why3*, *sig6*, *sig6why3* et *sig6why1*. Les photos sont prises à 4, 10, 15 et 21 jours après le semis des graines. La barre blanche correspond à environ 2 mm pour les photos à 4 et 10 jours. Pour les photos à 15 et 21 jours, la barre blanche représente une longueur d'environ 5 mm. (B) Auto-fluorescence de la chlorophylle chez Col-0 et les mutants à 4 jours. La barre blanche représente une taille d'environ 250 µm. (C-D) Quantification de la chlorophylle à (C) 4 jours et (D) 15 jours. La quantité est donnée relativement à Col-0. La barre d'erreur représente l'erreur-type à la moyenne des triplicatas biologiques. La présence de deux astérisques représente une différence significative au test *t* de Student avec  $p < 0.01$ .



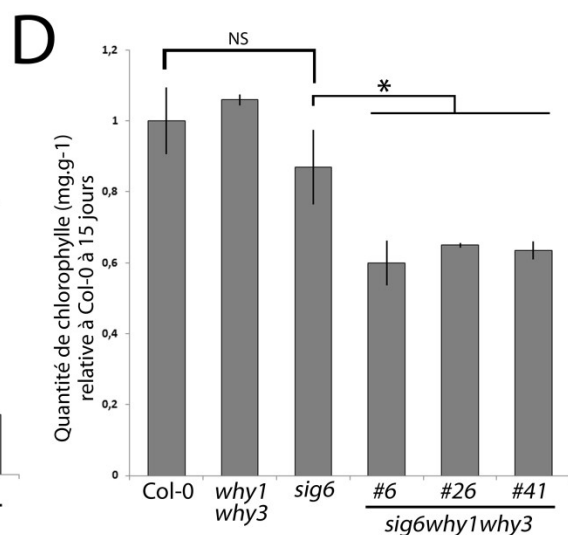
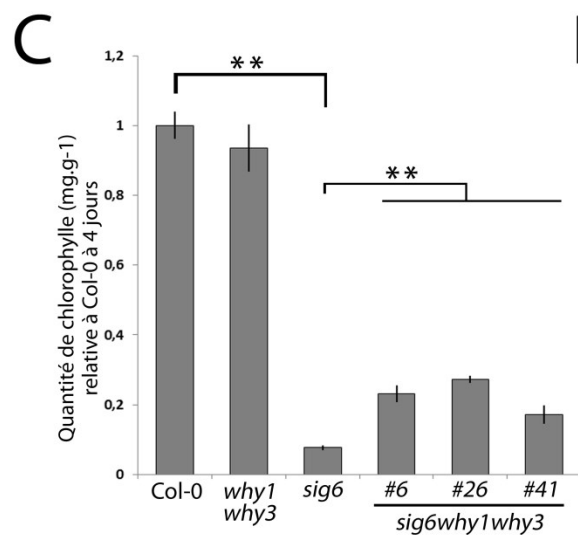
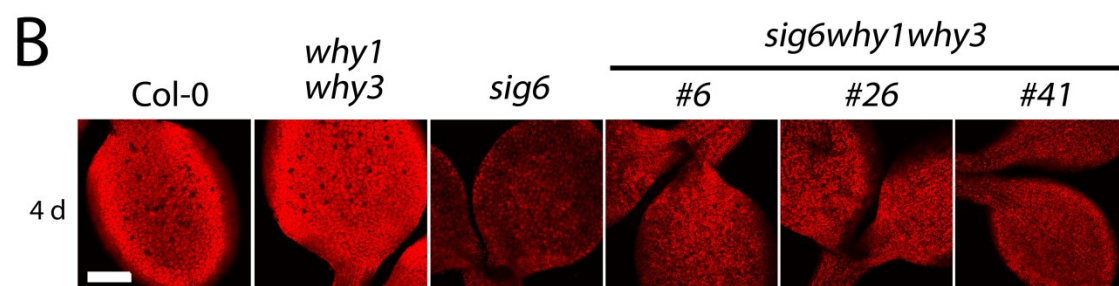
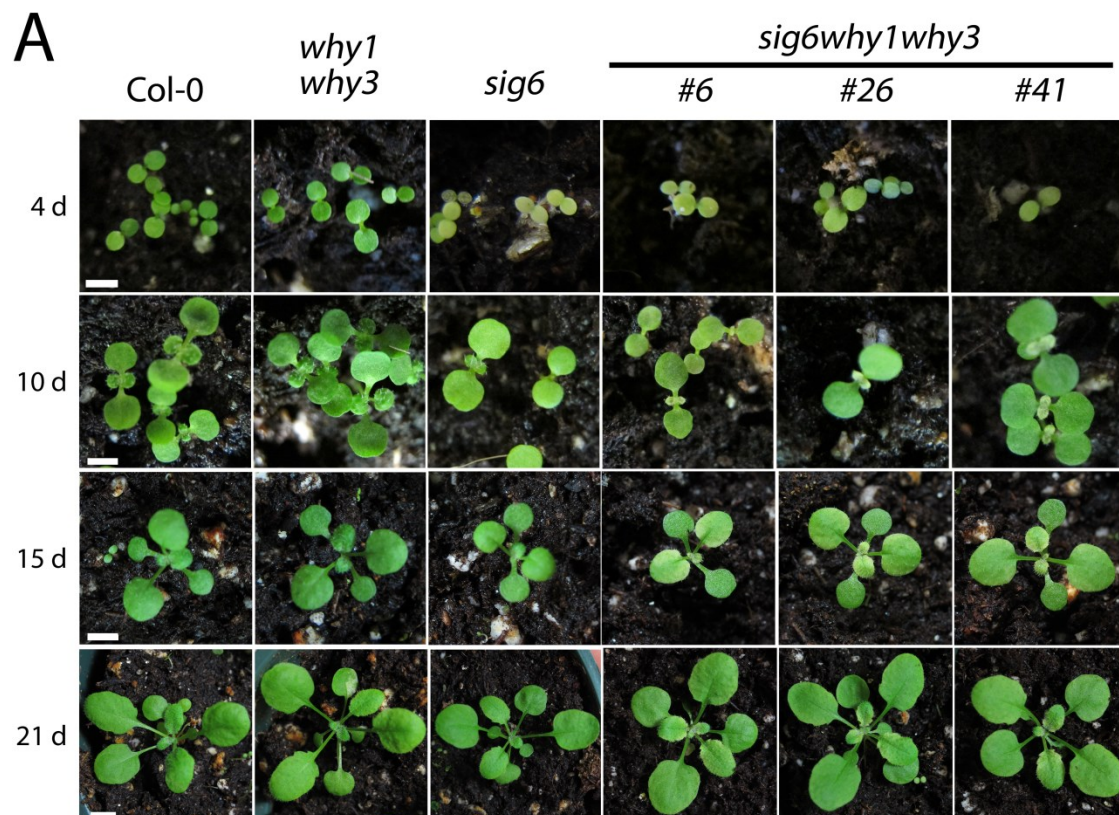
### **3.4. L'absence des deux Whirly complémente faiblement le phénotype de cotylédons pâles de *sig6* et provoque l'apparition d'un second phénotype tardif et persistant.**

Afin de vérifier si la perte des deux protéines WHY1 et WHY3 dans le mutant *sig6* pourrait également favoriser la complémentation et la perte de son phénotype de cotylédons pâles, les triples mutants *sig6why1why3* numéros 6, 26 et 41 isolés séparément ont été plantés sur terre. On remarque que la complémentation semble être présente à 4 jours mais de manière très faible (Figure 8A). L'auto-fluorescence de la chlorophylle observée par microscopie confocale nous le confirme également (Figure 8B). Afin d'obtenir une réponse plus quantitative, la chlorophylle *a* et *b* a été quantifiée chez les trois triples mutants *sig6why1why3*. On remarque qu'à 4 jours, le niveau de chlorophylle observé chez le simple mutant *sig6* passe de 10% du niveau de la plante sauvage, à 20% chez les triples mutants (Figure 8C). Cette augmentation de la quantité de chlorophylle du triple mutant *sig6why1why3* ne peut s'expliquer uniquement par l'absence des deux protéines WHY1 et WHY3 puisqu'un double mutant *why1why3* ne présente pas de différence phénotypique ou en quantité de chlorophylle comparativement à la plante de type sauvage (Figure 8A, 8B et 8C). Ainsi, cette complémentation révèle une interaction génétique entre les allèles *SIG6* et *WHY1/WHY3*. Cette différence significative (risque d'erreur de 1%) montre bien que l'absence des deux protéines WHIRLY permet de compenser, bien que faiblement, la déficience en chlorophylle du mutant *sig6*.

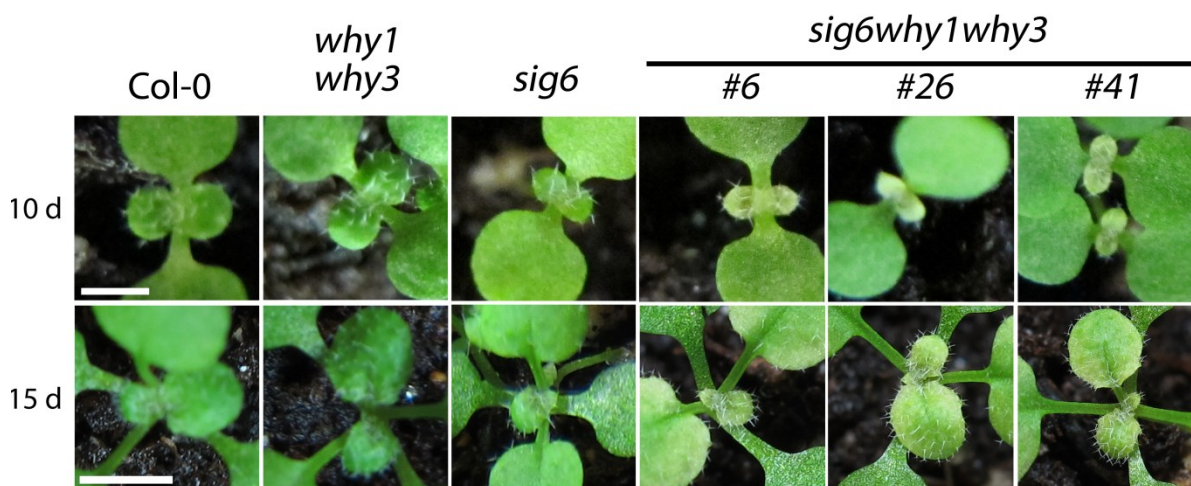
---

**Figure 8 (page suivante) : La double mutation *why1why3* complémente faiblement le phénotype du mutant *sig6*.** (A) Photos des phénotypes de Col-0 et des mutants *why1why3*, *sig6* et *sig6why1why3*. Les photos sont prises à 4, 10, 15 et 21 jours après le semis des graines. La barre blanche correspond à environ 2 mm pour les photos à 4 et 10 jours. Pour les photos à 15 et 21 jours, la barre blanche représente une longueur d'environ 5 mm. (B) Auto-fluorescence de la chlorophylle chez Col-0 et les mutants à 4 jours. La barre blanche représente une taille d'environ 250  $\mu$ m. (C) Quantification de la chlorophylle à 4 jours. (D) Quantification de la chlorophylle à 15 jours. La quantité est donnée relativement à Col-0 à 4 jours (C) ou à 15 jours (D). La barre d'erreur représente l'erreur-type à la moyenne des triplicatas biologiques. La présence de deux astérisques et un astérisque représentent une différence significative au test *t* de Student avec respectivement  $p < 0.01$  et  $p < 0.05$ . NS représente une différence non significative.





Bien qu'après 10 jours les mutants *sig6* ne présentent aucune différence phénotypique avec les plantes de type sauvage, on constate que, chez les triples mutants *sig6why1why3*, un second phénotype apparaît (Figure 8A). Des photos prises en gros plan des zones affectées sont présentées en Figure 9. On remarque l'apparition d'un jaunissement généralisé sur les jeunes premières vraies feuilles (10 jours, Figure 9). Par la suite, ce jaunissement est limité à la partie inférieure de celles-ci (15 jours, Figure 9). Les feuilles suivantes sont également affectées de la même manière. Ce phénotype persiste jusqu'au vieillissement de la plante (21 jours, Figure 8A).



**Figure 9 : Les mutants *sig6why1why3* présentent un phénotype tardif et persistant.** Agrandissement des photos des phénotypes de Col-0 et des mutants *why1why3*, *sig6* et *sig6why1why3*. Les photos sont prises à 10 et 15 jours après le semis des graines. La barre blanche correspond à environ 1.5 mm pour les photos à 10 jours. Pour les photos à 15 jours, la barre blanche représente une longueur d'environ 4.5 mm.

Ce phénotype persistant s'associe avec une déficience de la chlorophylle chez les triples mutants *sig6why1why3*. En effet, la quantification de la chlorophylle montre que, à 15 jours (Figure 8D), les triples mutants présentent un niveau plus faible de chlorophylle *a* et *b* que le mutant *sig6* (risque d'erreur de 5%). Pour sa part, le mutant *sig6* ne présente aucune différence significative avec la plante sauvage.



En conclusion, on remarque que l'absence des deux protéines WHY1 et WHY3 dans le mutant *sig6* ne favorise une complémentation que partielle et faible du phénotype de *sig6*. La biogénèse semble ainsi partiellement rétablie dans le triple mutant aux premiers stades de développement de la plante. Par contre cette légère complémentation s'accompagne de l'apparition d'un phénotype persistant au niveau des parties jeunes de la plante. En effet, les nouvelles vraies feuilles présentent toutes un phénotype de jaunissement sur la jeune feuille au complet, puis limité au niveau du méristème par la suite avant de disparaître une fois la feuille complètement formée.

### **3.5. L'expression de protéines chloroplastiques impliquées dans la photosynthèse est rétablie fortement dans les doubles mutants et moins chez le triple mutant à 4 jours.**

Le phénotype de cotylédons pâles du mutant *sig6* est associé avec une diminution de la transcription de certains gènes chloroplastiques, notamment ceux transcrits par la PEP, ou une augmentation de la transcription des gènes NEP-dépendants (Loschelder et al., 2006; Woodson et al., 2012).

Afin de vérifier si la complémentation du phénotype de *sig6* par les mutations *why1* ou *why3* pourrait être due à une réexpression des protéines chloroplastiques, nous avons quantifié quelques-unes des protéines impliquées dans la photosynthèse. Pour cela, les protéines totales des jeunes plantes de 4 jours ont été extraites et 20 µg ont été séparées sur gel de polyacrylamide. Finalement, un immuno-buvardage de type Western a été réalisé après transfert des protéines sur membrane de nitrocellulose et incubation avec des anticorps dirigés contre les protéines suivantes : **RBCL** (grosse sous-unité de la RubisCO (Ribulose-1,5-bisphosphate Carboxylase Oxygenase), gène ATCG00490), **PSBA** (protéine D1 de liaison de la chlorophylle au cœur du centre réactionnel du Photosystème II, gène ATCG00020), **PSAA** (centre réactionnel du Photosystème I, gène ATCG00350) et **ATPB** (sous-unité β de l'ATP-Synthase, gène ATCG00480). L'immuno-buvardage a été réalisé deux fois de manières indépendantes et la Figure 10 présente un résultat représentatif de

ces deux expériences. Une quantification de la membrane d'immuno-buvardage a été réalisé avec le logiciel ImageLab et ImageJ avec des résultats similaires. Les histogrammes présentent les résultats de la quantification de la membrane visible à la Figure 10A par ImageLab.

Tout d'abord, on remarque que le niveau de la protéine RBCL est plus faible chez le mutant *sig6* que chez la plante sauvage Col-0 (15% du niveau normal). Cependant, chez les doubles mutants *sig6why3* et *sig6why1*, la quantité de protéines RBCL revient à la normale (Figure 10A et 10B). Chez le triple mutant *sig6why1why3*, l'expression de la protéine est également rétablie malgré une légère sous-expression (90% du niveau normal). Finalement, on remarque aussi que le double mutant *why1why3* surexprime légèrement la protéine RBCL (120% du niveau normal) (Figure 10B).

Pour ce qui est de PSBA, la quantité de protéine présente chez le mutant *sig6* est également inférieure (5% du niveau normal) à la plante de type sauvage (Figure 10A et 10C). Chez les doubles mutants, toutefois, l'expression de la protéine augmente comparativement au mutant *sig6*. La quantité de PSBA chez *sig6why1* et *sig6why3* demeure cependant plus de 2 fois plus faible que chez la plante de type sauvage (40% du niveau normal). Chez le triple mutant *sig6why1why3*, on remarque que l'expression de la protéine PSBA ne varie pas comparativement au mutant *sig6* (10% du niveau normal). Le double mutant *why1why3* sous-exprime également la protéine PSBA (65% du niveau normal) (Figure 10C).

La protéine PSAA, quant à elle, est légèrement sous-exprimée chez le mutant *sig6* (65% du niveau normal), tout comme chez le double mutant *sig6why3* (Figure 10A et 10D). Le double mutant *sig6why1*, à l'inverse, surexprime légèrement cette protéine (120% du niveau normal), tout comme le triple mutant *sig6why1why3* (130% du niveau normal). On remarque donc une différence entre les deux doubles mutants *sig6why1* et *sig6why3*. Pour

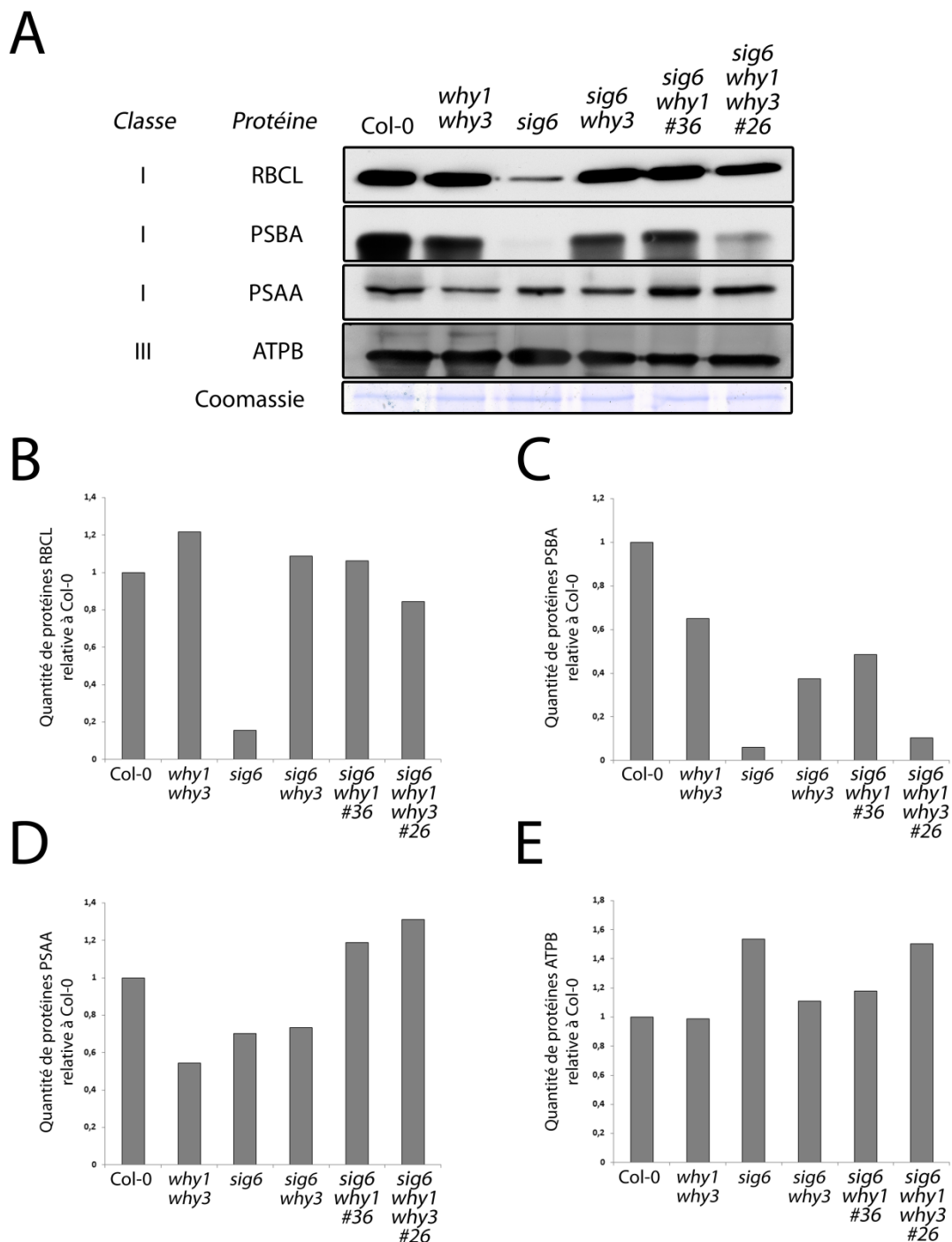
terminer, on remarque que le double mutant *why1why3* sous-exprime la protéine PSAA (55% du niveau normal) (Figure 10D).

Finalement, on remarque que le niveau de protéine ATPB est plus élevé chez le mutant *sig6* que chez la plante de type sauvage (160% du niveau normal) (Figure 10A et 10E). Cette surexpression est abolie chez les doubles mutants *sig6why1* et *sig6why3* mais pas chez le triple mutant *sig6why1why3* (150% du niveau normal). Le double mutant *why1why3* ne présente quant à lui aucune différence avec la plante de type sauvage.

En résumé, on constate que la complémentation de *sig6* chez *sig6why3* et *sig6why1* est associée à une augmentation de l'expression de protéines chloroplastiques impliquées dans la photosynthèse comparativement au mutant *sig6*. Cette complémentation est, dans certains cas, l'abolition, partielle ou totale, chez les doubles mutants, de la sous-expression présente dans le mutant *sig6*, comme démontré par le niveau des protéines RBCL, PSBA ou PSAA ou encore l'abolition d'une surexpression comme le démontre le cas de la protéine ATPB.

On remarque également une plus grande disparité au niveau de l'expression des protéines chloroplastiques chez le triple mutant *sig6why1why3*. En effet, certaines protéines restent pratiquement au même niveau que le mutant *sig6*, comme ATPB ou PSBA. Dans ce cas, la sous-expression ou la surexpression est présente chez le simple mutant *sig6* et le triple mutant *sig6why1why3*. D'autres, par contre, comme la protéine RBCL, semblent revenir à une quantité normale chez le triple mutant. Finalement, certaines protéines sont exprimées de manière inverse chez le triple mutant par rapport au simple mutant *sig6*. C'est le cas par exemple de la protéine PSAA, sous-exprimée chez le simple mutant et surexprimée chez le triple mutant *sig6why1why3*.

Finalement, on remarque que le double mutant *why1why3* présente, à 4 jours, un problème d'expression de certaines protéines chloroplastiques telles que PSBA ou PSAA.



**Figure 10 : L'expression des protéines chloroplastiques est rétablie dans les doubles mutants à 4 jours.** (A) Immuno-buvardage de type Western des protéines RBCL, PSBA, PSAA et ATPB. La classe des gènes encodant pour ces protéines est inscrite à gauche du nom de la protéine. Une bande colorée au Bleu de Coomassie sert de contrôle d'équilibration du niveau de protéines totales. Les photos sont représentatives de deux expériences indépendantes. (B-E) Intensité relative à l'intensité des bandes chez Col-0. L'intensité est calculée avec le logiciel ImageLab et est représentative d'une double quantification par ImageLab et ImageJ.

### **3.6. L'expression de gènes nucléaires impliqués dans la photosynthèse est également rétablie à 4 jours chez les doubles mutants.**

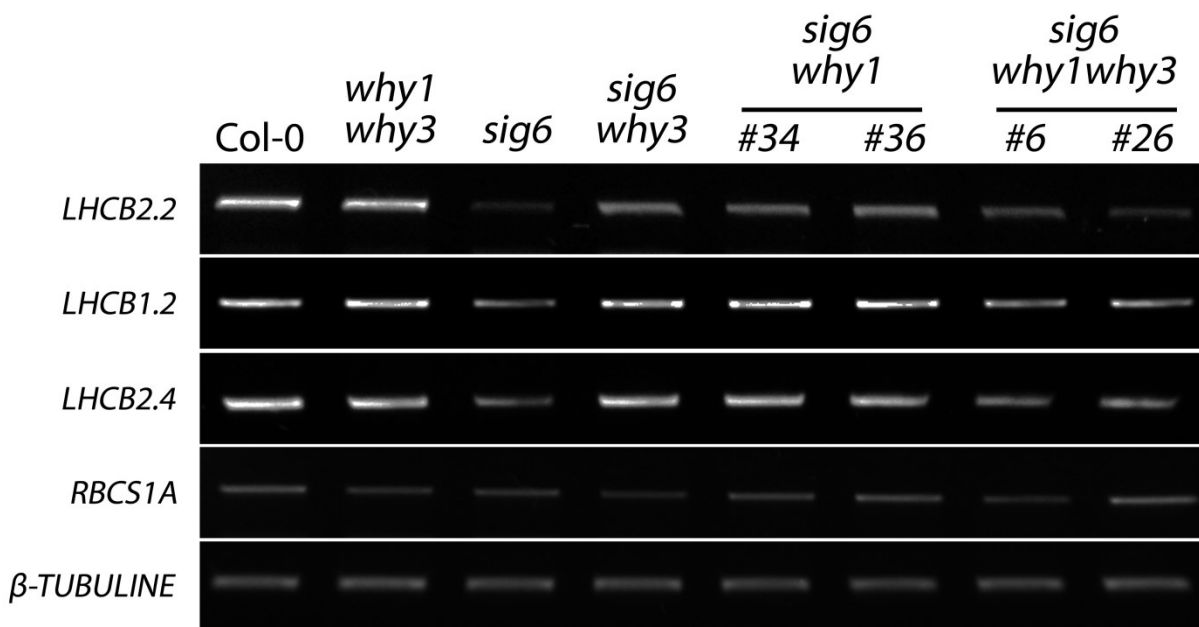
La perte d'expression de certains gènes chloroplastiques chez *sig6* ainsi que le problème d'homéostasie protéique qui en découle s'accompagnent de la sous-expression de certains gènes nucléaires codant pour des protéines photosynthétiques (Woodson et al., 2012).

Afin de vérifier si le rétablissement de l'expression des protéines chloroplastiques, chez les doubles mutants, s'accompagne également d'une réexpression normale des gènes nucléaires, nous avons quantifié l'expression des gènes nucléaires suivants : **LHCB1.2**, **LHCB2.2** et **LHCB2.4** (*Light Harvesting Chlorophyll a/b-Binding protein*, gènes respectifs AT1G29910, AT2G05070 et AT3G27690) et le gène **RBCS1A** (*Ribulose Biphosphate Carboxylase Small subunit 1A*, gène AT1G67090). Ces gènes encodent des protéines impliquées dans la photosynthèse. Les trois gènes *LHCB* sont sous-exprimés dans le mutant *sig6* (Woodson et al., 2012). Les protéines LHCB fixent la chlorophylle *a* et *b* dans les antennes collectrices de lumière (photosystèmes I et II) tandis que la protéine RBCS1A est l'un des membres de la petite sous-unité de la RubisCO. Pour cela, nous avons extrait l'ARN total de jeunes plantes à 4 jours, puis, après synthèse du brin d'ADN complémentaire et équilibration du niveau total d'ADNc par amplification du gène de la  $\beta$ -*TUBULINE*, nous avons effectué une RT-PCR semi-quantitative avec des amorces spécifiques aux gènes mentionnés ci-haut. Ces résultats préliminaires nous ont ainsi permis de vérifier, de manière générale, la tendance dans l'expression des gènes nucléaires impliqués dans la photosynthèse. Une RT-PCR quantitative pourrait toutefois, à l'avenir, être entreprise afin de valider ces résultats.

On remarque que les trois gènes de la famille des *LHCB* sont sous-exprimés chez le mutant *sig6* comparativement à la plante de type sauvage (Figure 11). Cette sous-expression est plus ou moins fortement abolie chez les doubles-mutants *sig6why1* et *sig6why3*. En revanche, chez le triple mutant *sig6why1why3*, l'expression de ces trois

gènes reste plutôt similaire au niveau d'expression du mutant *sig6* (Figure 11). Le double mutant *why1why3*, quant à lui, ne présente aucune variation dans l'expression des gènes nucléaires photosynthétiques et est totalement similaire à la plante de type sauvage.

L'abolition observée, chez les doubles mutants, de la sous-expression de ces trois gènes comparativement au mutant *sig6*, ne semble pas être due à une augmentation globale de l'expression des gènes nucléaires photosynthétiques des doubles mutants. En effet, on remarque que le gène *RBCS1A*, exprimé à un niveau normal chez le mutant *sig6*, n'est pas surexprimé chez les divers autres mutants, rejetant ainsi l'hypothèse que les doubles mutants *sig6why1* et *sig6why3* expriment plus fortement les gènes nucléaires de manière constitutive par rapport au mutant *sig6* (Figure 11).



**Figure 11 : L'expression des gènes nucléaires associés à la photosynthèse est rétablie dans les doubles-mutants à 4 jours.** RT-PCR semi-quantitative des gènes nucléaires *LHCB2.2*, *LHCB1.2*, *LHCB2.4* et *RBCS1A*. L'amplification du gène de la  $\beta$ -TUBULINE sert de contrôle d'équilibrage du niveau d'ARN total. Les photos de gels d'agarose sont représentatives de deux expériences indépendantes.

### **3.7. L'expression des protéines chloroplastiques est anormale après 10 jours de développement chez le triple mutant.**

Le triple mutant *sig6why1why3* présente un second phénotype persistant au cours de sa vie en plus d'une déficience en chlorophylle *a* et *b* comme nous l'avons vu précédemment (Figure 8 et 9). Afin de vérifier si ce phénotype est associé à une expression anormale des protéines chloroplastiques à 10 jours, nous avons effectué une extraction des protéines totales suivie d'un immuno-buvardage de type Western. Les protéines détectées sont les mêmes que celles observées plus haut à 4 jours : RBCL, PSBA, PSAA et ATPB. L'immuno-buvardage a été réalisé deux fois de manières indépendantes et la Figure 10 présente un résultat représentatif de ces deux expériences. Une quantification de la membrane d'immuno-buvardage a été réalisée avec le logiciel ImageLab et ImageJ avec des résultats similaires. Les histogrammes présentent les résultats de la quantification de la membrane visible à la Figure 12A par ImageLab.

On remarque que l'expression de la protéine RBCL est plus forte chez le mutant *sig6* (140% du niveau normal) et le semble également chez les doubles mutants *sig6why3* et *sig6why1* (120% du niveau normal) (Figure 12A et 12B). La protéine RBCL est, par contre, particulièrement sous-exprimée chez le triple mutant *sig6why1why3*. Le niveau de RBCL est normal dans le double mutant *why1why3*.

La protéine PSBA, quant à elle, est plus fortement exprimée dans l'ensemble des mutants étudiés (Figure 12A et 12C). En effet, le mutant *sig6* présente un niveau de protéine PSBA 2 fois plus élevé que la plante de type sauvage. Chez les doubles mutants *sig6why1* et *sig6why3*, cette surexpression est encore plus importante (3 fois en moyenne). Le triple mutant *sig6why1why3*, également, surexprime la protéine environ 3 fois (Figure 12A et 12C). Finalement, on remarque qu'un double mutant *why1why3* semble également surexprimer près de 2.5 fois la protéine PSBA.

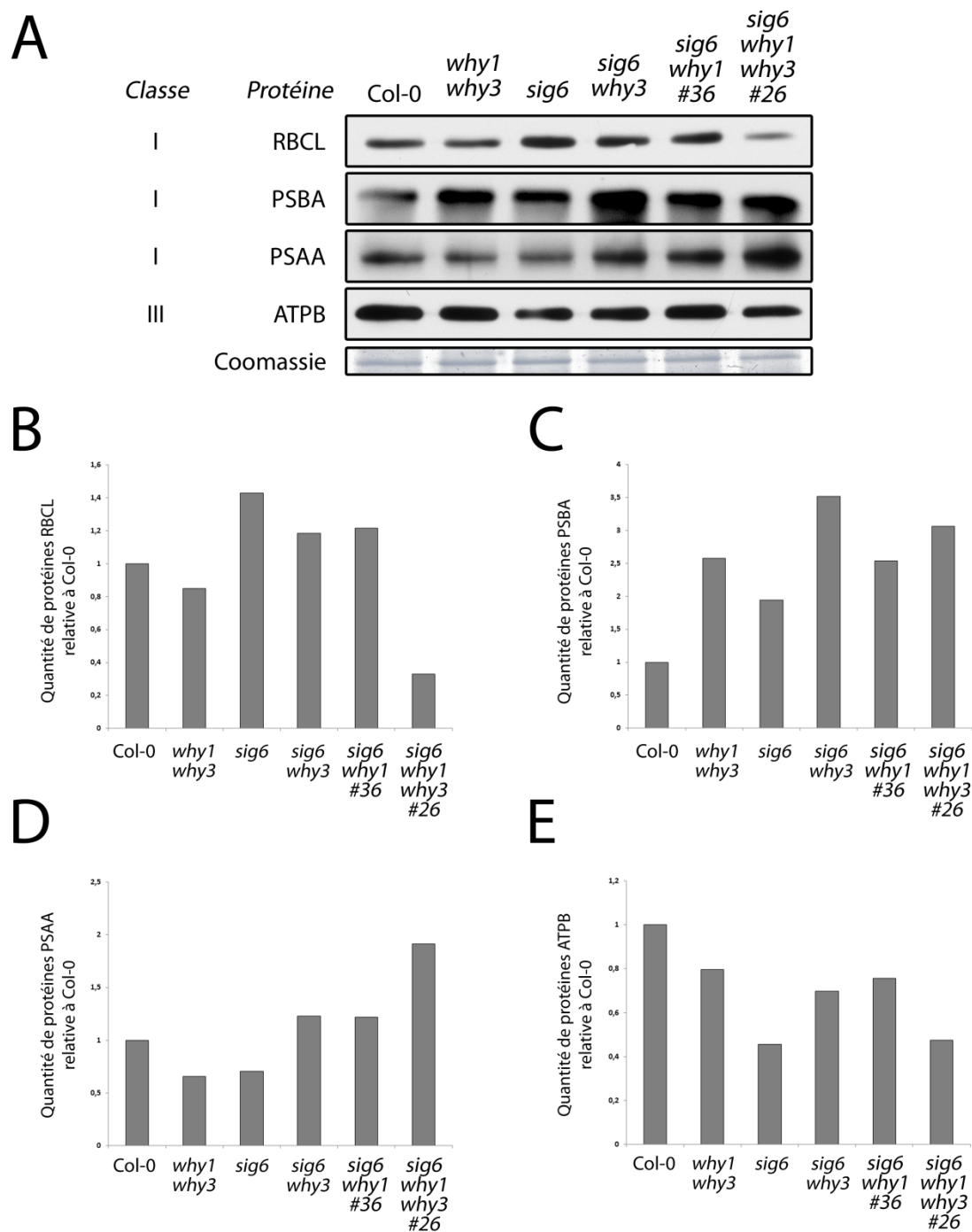
Concernant le niveau de protéine PSAA, on remarque que, bien qu'on note la présence d'une légère sous-expression chez le mutants *sig6* (environ 70% du niveau

normal), les doubles mutants sur-expriment la protéine (125% du niveau normal) (Figure 12A et 12D). Cependant, c'est chez le triple mutant *sig6why1why3* que cette surexpression est la plus forte puisque la protéine est 2 fois plus exprimée. Le double mutant *why1why3*, quant à lui, sous-exprime la protéine PSAA (70% du niveau normal) (Figure 12A et 12D).

Finalement, on remarque que la protéine ATPB est sous-exprimée dans l'ensemble des mutants. Cette sous-expression est importante dans le mutant *sig6* (45% du niveau normal). Chez les doubles mutants *sig6why3* et *sig6why1*, la sous-expression est plus légère (70% du niveau normal). Toutefois, chez le triple mutant *sig6why1why3*, cette sous-expression est tout aussi forte que chez le mutant *sig6* (45% du niveau normal). Le double mutant *why1why3* sous-exprime également légèrement la protéine ATPB (80% du niveau normal) (Figure 12A et 12E).

En résumé, le simple mutant sous-exprime certains gènes (PSAA et ATPB) et en surexprime d'autres (RBCL et PSBA). Les doubles mutants *sig6why3* et *sig6why1*, quant à eux, présentent des niveaux de protéines situés entre le mutant *sig6* et la plante de type sauvage, exceptée pour la protéine PSBA. Chez le triple-mutant *sig6why1why3*, par contre, le schéma d'expression des protéines étudiées est variable. La protéine ATPB est exprimée au même niveau que chez *sig6*, tandis que les protéines PSBA et PSAA sont fortement surexprimées et que la protéine RBCL est fortement sous-exprimée (Figure 12). On peut également remarquer que le double mutant *why1why3* présente une légère sous-expression de certaines protéines chloroplastiques telles que RBCL, ATPB ou PSAA, ou une surexpression forte de protéines telle que PSBA.





**Figure 12 : L'expression des protéines chloroplastiques est anormale chez le triple mutant à 10 jours.** (A) Immuno-buvardage de type Western des protéines RBCL, PSBA, PSAA et ATPB. La classe des gènes encodant pour ces protéines est inscrite à gauche du nom de la protéine. Une bande colorée au Bleu de Coomassie sert de contrôle d'équilibrage du niveau de protéines totales. Les photos sont représentatives de deux expériences indépendantes. (B-E) Intensité relative à l'intensité des bandes chez Col-0. L'intensité est calculée avec le logiciel ImageLab et est représentatif d'une double quantification avec les logiciels ImageLab et ImageJ.

### **3.8. Le triple mutant *sig6why1why3* présente moins de réarrangements que le double mutant *why1why3*.**

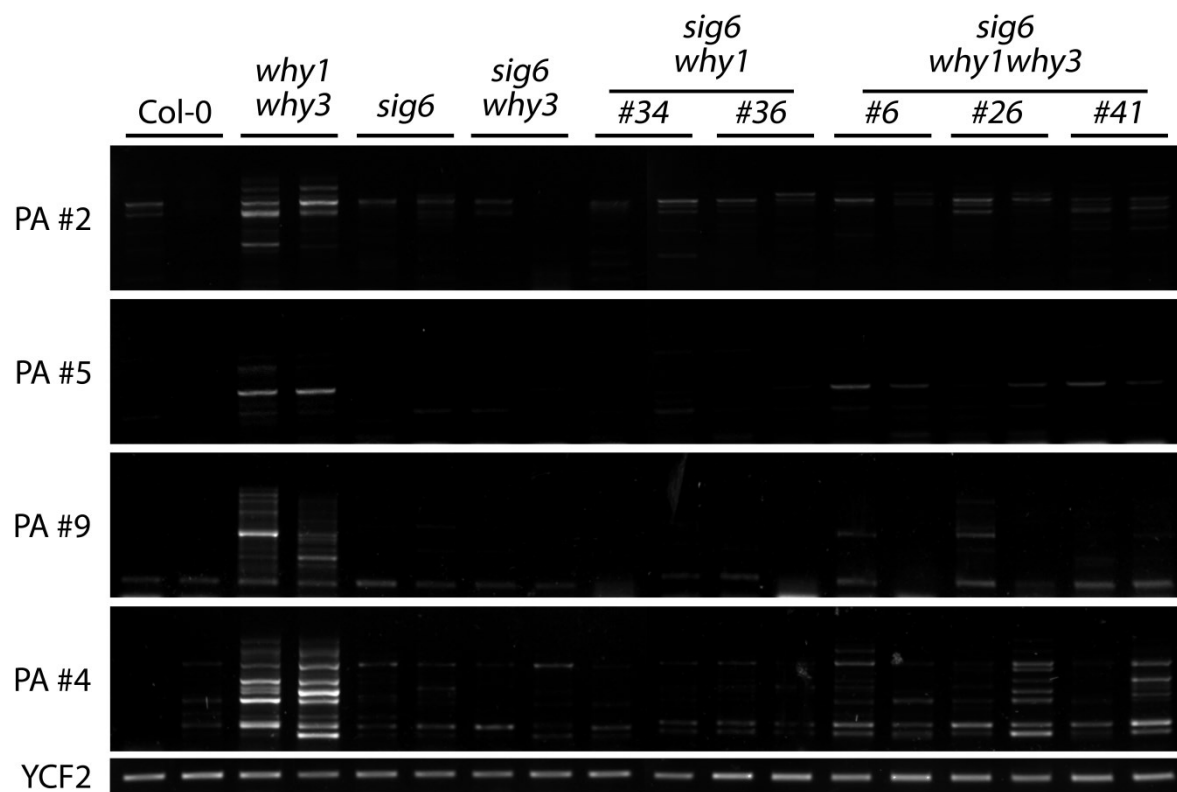
Les mutations *why1* et *why3*, dans le double mutant *why1why3*, provoquent l'apparition de molécules d'ADN chloroplastique réarrangées suite à des bris doubles-brins réparés de manière non-homologue. Ceci est dû à l'absence des protéines WHIRLY et leur implication dans les mécanismes de réparation homologue de l'ADN (Maréchal et al., 2009; Cappadocia et al., 2010). Ces réarrangements sont réalisés par l'intermédiaire de micro-homologies, d'une taille de 3 à 20 paires de bases (Maréchal et al., 2009).

Afin de vérifier si la présence de réarrangements dans le génome chloroplastique pouvait être à l'origine de la forte complémentation du phénotype de *sig6* chez les doubles mutants *sig6why1* et *sig6why3*, et pour vérifier également si les réarrangements sont à l'origine de l'apparition d'un phénotype persistant chez le triple mutant, nous avons effectué une réaction de PCR permettant de détecter ces réarrangements et d'estimer leur quantité dans le génome chloroplastique des plantes à 21 jours. La technique utilise pour cela des amorces qui se font face, mais séparées par environ 10 000 paires de bases, ou encore des amorces dos-à-dos. En présence de réarrangements tels que des duplications ou des délétions, les amorces sont alors capables de donner lieu à l'amplification d'un produit (Cappadocia et al., 2010). Le nombre ou l'intensité des produits détectés donne alors une estimation de la quantité de réarrangements dans le génome chloroplastique.

Comme attendu, le double mutant *why1why3* possède une grande quantité de réarrangements dans le génome chloroplastique puisque les 4 différentes paires d'amorces utilisées permettent l'amplification de nombreux produits (Figure 13). On remarque également que la mutation *sig6* ne provoque pas l'apparition de réarrangements. Finalement, les doubles mutants *sig6why3* et *sig6why1* ne présentent pas plus de réarrangements que le niveau de base observé dans la plante de type sauvage ou dans le mutant *sig6* (Figure 13).

Le triple mutant *sig6why1why3*, quant à lui, possède à peine plus de réarrangements que le niveau de base observé chez Col-0 pour la plupart des réactions effectuées (Figure 13). Cependant, le triple mutant *sig6why1why3* présente un niveau de réarrangements génomiques chloroplastiques plus faible que le double mutant *why1why3*, présentant pourtant les mêmes mutations *why1* et *why3*.

En conclusion, la complémentation forte observée chez les doubles mutants *sig6why3* et *sig6why1* ne semble pas avoir pour origine la présence de réarrangements génomiques chloroplastiques. De plus, on peut affirmer que le phénotype persistant observé chez le triple mutant *sig6why1why3* n'apparaît pas suite à une augmentation du nombre de ces réarrangements. Finalement, on remarque que la présence de la mutation *sig6* dans le mutant *why1why3* défavorise même l'apparition de réarrangements dans le génome chloroplastique.



**Figure 13 : Le triple mutant *sig6why1why3* accumule moins de réarrangements que le double mutant *why1why3*.** Détection des réarrangements du génome chloroplastique par PCR. Les paires d'amorces utilisées pour effectuer les réactions sont indiquées à gauche des photos de gel avec PA #2 signifiant paire d'amorces numéro 2. Les séquences correspondantes sont données dans le Tableau I. L'amplification de l'ADN correspondant au gène chloroplastique *YCF2* sert de contrôle d'équilibration du niveau d'ADN chloroplastique. Les réactions sont réalisées en duplicata biologique pour chaque lignée testée. Les réactions montrées sont représentatives de 8 réactions effectuées.

### **3.9. Un traitement à faible dose de rifampicine est capable de compléter également le phénotype du mutant *sig6*.**

Afin de vérifier si l'inhibition de la transcription chloroplastique, plus particulièrement de la PEP (l'ARN polymérase encodée par le génome chloroplastique), pouvait être à l'origine de la complémentation du phénotype du mutant *sig6* observée à 4 jours, nous avons fait pousser ce mutant sur un milieu de culture contenant des doses croissantes de rifampicine. La rifampicine est un antibiotique capable d'inhiber l'ARN polymérase d'origine bactérienne en empêchant l'élongation du transcrit naissant (Campbell et al., 2001). Elle est donc utilisée dans le but de tuer les bactéries en empêchant la transcription des gènes. Cet antibiotique peut également être utilisé dans le but d'inhiber la transcription chloroplastique puisqu'il a été montré que la rifampicine inhibe spécifiquement la polymérase PEP d'origine bactérienne et non la NEP de type phagique (Liere and Maliga, 1999; Kuhn et al., 2007; Liere et al., 2011).

La plante de type sauvage ainsi que le mutant *sig6* (*sig6-3*) ont donc été plantés sur un milieu de culture ne contenant pas de rifampicine (0 mg/L) ou complété avec 25, 100, 500 ou 1000 mg/L de rifampicine. Des photos ont ensuite été prises à 5 jours. On remarque que le traitement de 0 à 100 mg/L de rifampicine sur la plante sauvage n'a aucun effet sur le phénotype et ne provoque aucune variation significative de la quantité de chlorophylle contenue dans la plante (Figure 14A et 14B). Une dose de 500 mg/L de rifampicine, par contre provoque l'apparition d'un retard de croissance ainsi qu'une diminution drastique de la quantité de chlorophylle (30% du niveau normal). Finalement, une dose élevée de rifampicine (1000 mg/L) entraîne un fort retard de croissance ainsi que l'apparition d'un phénotype de jaunissement (Figure 14A).

Le mutant *sig6* utilisé dans cette étude (*sig6-3*), quant à lui, présente le phénotype habituel de cotylédons pâles sans traitement à la rifampicine. On observe également une diminution de la quantité de chlorophylle contenue dans la plante (5 fois moins que la

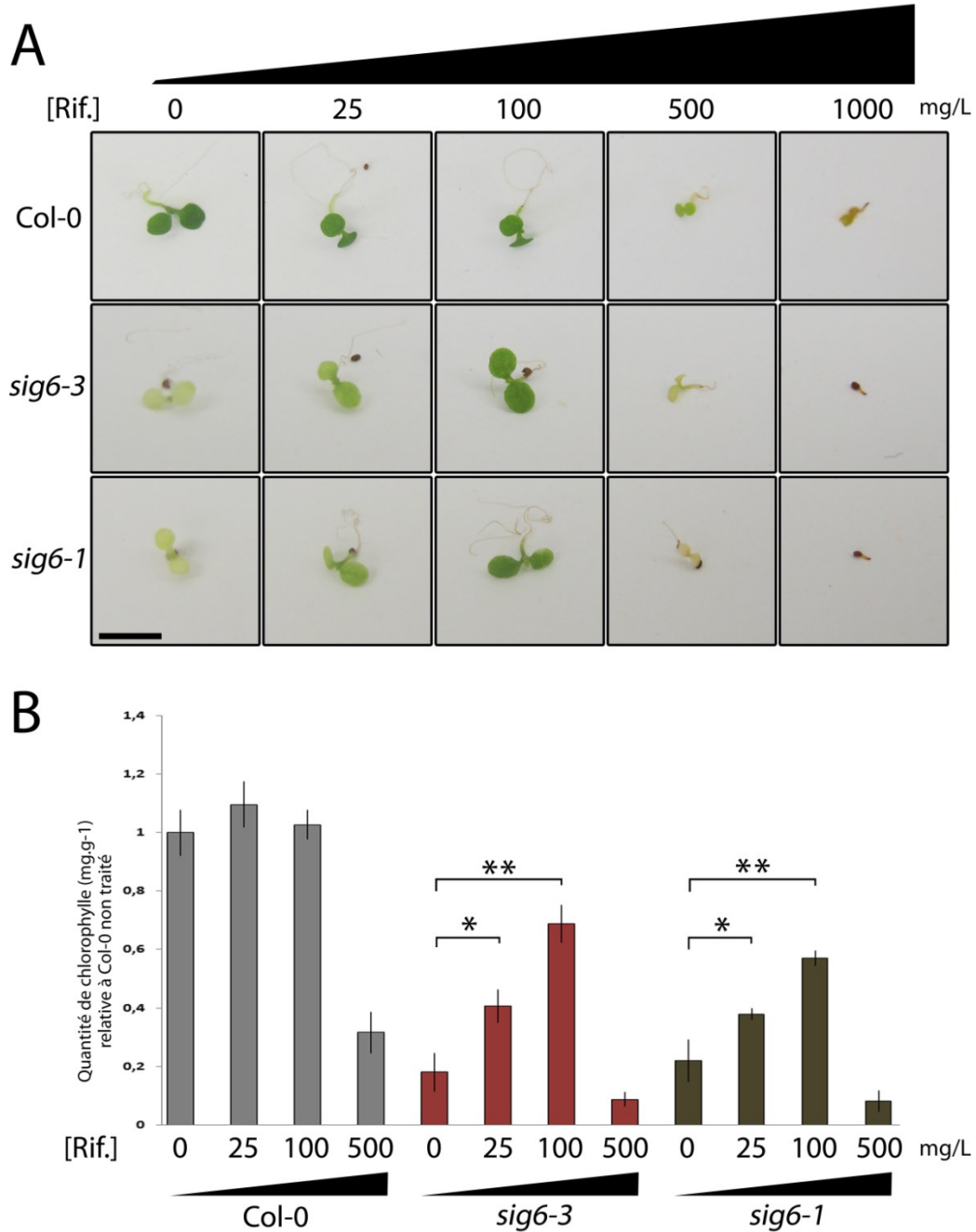
plante de type sauvage) (Figure 14A et 14B). Lorsque la plante est traitée avec 25 mg/L de rifampicine, on observe la perte du phénotype (Figure 14A). Ceci est confirmé par la quantification de la chlorophylle puisqu'on remarque que le mutant *sig6* traité contient près de deux fois plus de chlorophylle que le mutant non traité pour une même masse de plante (risque d'erreur de 5%) (Figure 14B). La quantité de chlorophylle reste toutefois 2.5 fois moins élevée que chez la plante de type sauvage.

Après traitement avec une dose 4 fois plus élevée de rifampicine (100 mg/L), on remarque que le mutant *sig6* perd complètement le phénotype de cotylédons pâles (Figure 14A). Également, la quantité de chlorophylle contenue dans la plante augmente de près de 5 fois (risque d'erreur de 1%) comparativement au mutant non traité pour atteindre 70% du niveau de la plante de type sauvage (Figure 14B). On remarque cependant qu'un traitement avec des doses très fortes de rifampicine telles que 500 ou 1000 mg/L ne provoque pas la disparition du phénotype de *sig6*. En effet, un traitement avec 500 mg/L provoque le jaunissement complet de la plante et également un retard de croissance tandis qu'un traitement 2 fois plus élevé (1000 mg/L) provoque l'absence quasi-totale de germination (Figure 14A et 14B).

Afin de confirmer ces résultats, une deuxième lignée mutante indépendante, *sig6-1* (Ishizaki et al., 2005), a été traitée à la rifampicine dans les mêmes conditions. On remarque que cette dernière réagit de manière similaire à la lignée mutante *sig6-3* (Figure 14A et 14B).

On peut conclure qu'une dose faible de rifampicine (25 ou 100 mg/L), c'est-à-dire ne provoquant pas d'effet visible au niveau phénotypique sur une plante de type sauvage, permet de compléter le phénotype de *sig6* de manière dose-dépendante. Ceci n'est, par contre, pas vrai lors d'un traitement à haute dose de rifampicine (500 ou 1000 mg/L) puisque le mutant *sig6* présente alors un jaunissement et semble même incapable de germer sur 1000 mg/L comparativement à la plante de type sauvage.

En conclusion, une faible inhibition de l'activité ARN polymérase de la PEP par la rifampicine semble donc compenser pour la perte du facteur sigma 6. Une inhibition forte de celle-ci en est, par contre, incapable.



**Figure 14 : Un traitement à faible dose de rifampicine est capable de compléter le phénotype du mutant *sig6*.** (A) Photos des phénotypes de Col-0 et des mutants *sig6-3* (*sig6* dans l'étude) et *sig6-1* traités ou non avec des doses croissantes de Rifampicine (25, 100, 500 et 1000 mg/L). Les photos sont prises 5 jours après la germination des graines. La barre noire correspond à environ 2 mm. (B) Quantification de la chlorophylle à 5 jours. La quantité est donnée relativement à Col-0 non traité à la Rifampicine. La barre d'erreur représente l'erreur-type à la moyenne des triplicatas biologiques. La présence de deux astérisques et un astérisque représentent une différence significative au test *t* de Student avec respectivement  $p < 0.01$  et  $p < 0.05$ .

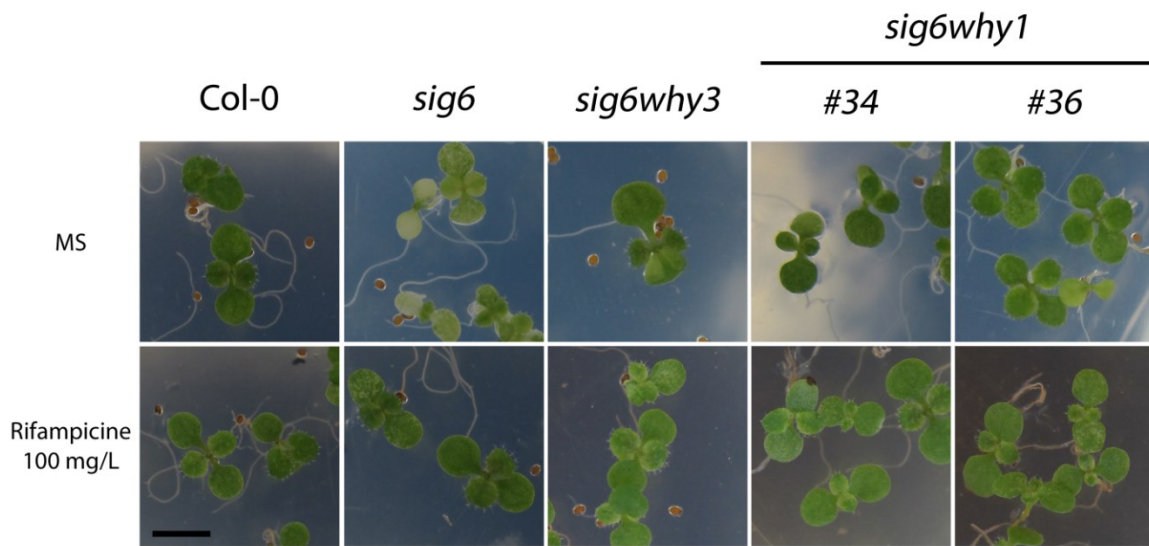


### **3.10. Un traitement à faible dose de rifampicine provoque l'apparition du phénotype tardif chez les doubles mutants *sig6why3* et *sig6why1* à 12 jours.**

Afin de vérifier si une inhibition de la transcription provoque l'apparition du phénotype persistant après 12 jours, nous avons cultivé les plantes mutantes *sig6* ainsi que les doubles mutants *sig6why3* et *sig6why1* sur une dose faible de rifampicine (100 mg/L).

On remarque que le traitement à 100 mg/L de rifampicine n'entraîne pas l'apparition d'un phénotype particulier sur les mutants *sig6* après 12 jours puisque celles-ci sont similaires aux plantes de type sauvage (Figure 15). Par contre, on constate que la même dose de rifampicine provoque, chez les doubles mutants *sig6why3* et *sig6why1*, l'apparition d'un contour jaune au niveau inférieur des premières vraies feuilles, qui ne se retrouve pas sans traitement à la rifampicine (Figure 15).

Ainsi, on peut conclure qu'une légère inhibition de l'ARN polymérase d'origine bactérienne (PEP) dans les doubles mutants *sig6why3* et *sig6why1* provoque l'apparition d'un phénotype tardif sur les plantes à 12 jours.



**Figure 15 : Un traitement à faible dose de rifampicine provoque l'apparition du phénotype persistant chez les doubles mutants.** Photos des phénotypes des mutants *sig6*, *sig6why3*, et *sig6why1* traités ou non avec 100 mg/L de Rifampicine. Les photos sont prises 12 jours après la germination des graines. La barre noire correspond à environ 2 mm.

### **3.11. La protéine SIG6 n'interagit pas directement avec les protéines WHY1 ou WHY3.**

Dans le but de vérifier si l'interaction génétique observée entre les allèles *SIG6* et *WHY1* et entre les allèles *SIG6* et *WHY3* tire son origine d'une interaction protéique directe entre les deux protéines *SIG6* et *WHY1* ou entre *SIG6* et *WHY3*, et étant donné le résultat de criblage en double-hybride ayant été obtenu précédemment au laboratoire dans lequel il a été trouvé que l'un des interacteurs potentiel de la protéine *WHY1* pourrait être la protéine *SIG6*, nous avons testé l'interaction entre *SIG6* et *WHY1* ou *WHY3* dans une expérience de double-hybride en levure.

Dans cette technique, la séquence codante pour la protéine *SIG6*, sans son peptide signal permettant le ciblage intracellulaire dans le chloroplaste, et additionnée d'un Strep-Tag, a été clonée dans un plasmide en aval d'un gène codant pour le domaine d'interaction à l'ADN de la protéine *GAL4* (pGBK-SIG6). La séquence codante pour la protéine *WHY1*, sans le peptide signal, a également été clonée dans un plasmide en aval d'un gène codant pour le domaine d'interaction à l'ADN de la protéine *GAL4* (pGBK-WHY1). Le marqueur de sélection de ces deux plasmides est un gène nécessaire à la synthèse du tryptophane. Les séquences codantes pour les protéines *WHY1* et *WHY3*, sans le peptide de transit vers le chloroplaste, ont été clonées dans un plasmide en aval d'un gène codant pour le domaine de trans-activation de la protéine *GAL4* (respectivement pGAD-WHY1 et pGAD-WHY3). Le marqueur de sélection pour ces deux plasmides est un gène nécessaire à la synthèse de leucine. Parmi ces quatre plasmides, deux ont ensuite été co-transformés dans une souche de levure dont les gènes nécessaires à la synthèse d'histidine et d'adénine sont sous le contrôle d'un promoteur dépendant de la protéine *GAL4*. Si les protéines interagissent, elles permettent le rapprochement des deux domaines de la protéine *GAL4* et la transcription des gènes nécessaires à la synthèse d'histidine ou d'adénine. Dans ce cas, les levures co-transformées avec les plasmides correspondant sont capables de survivre sur un milieu minimal sans les acides aminés histidine ou adénine. Dans le cas où il n'y a pas d'interaction, les levures ne peuvent survivre.

On remarque que la souche de levure non transformée (pJ69-4a) est incapable de survivre sur un milieu sans leucine et tryptophane et également sans la présence d'histidine ou d'adénine (contrôle négatif de l'expérience). Les autres souches co-transformées avec les deux plasmides sont capables de pousser en l'absence de tryptophane ou de leucine, validant ainsi la transformation des levures avec les différents plasmides (Figure 16A).

On remarque également que la souche co-transformée avec les plasmides contenant la protéine WHY1 fusionnée avec le domaine de liaison à l'ADN ainsi que WHY1 fusionnée avec le domaine de trans-activation sont capables de survivre sur un milieu sans histidine et adénine (contrôle positif de l'expérience) (Figure 16A). En effet, la protéine WHY1 est ici utilisée comme témoin positif étant donnée sa capacité d'homotétramérisation (Cappadocia et al., 2010; Cappadocia et al., 2012). On constate finalement que les autres souches exprimant la protéine SIG6 fusionnée avec le domaine d'interaction à l'ADN ainsi que les protéines WHY1 ou WHY3 fusionnées avec le domaine de trans-activation sont incapables de survivre sur un milieu minimal sans histidine et adénine (Figure 16A). On conclut donc que le système utilisé ici ne permet pas de démontrer la présence d'une interaction protéique entre la protéine SIG6 et les protéines WHY1 ou WHY3, du moins, pas entre leur C-terminaux.

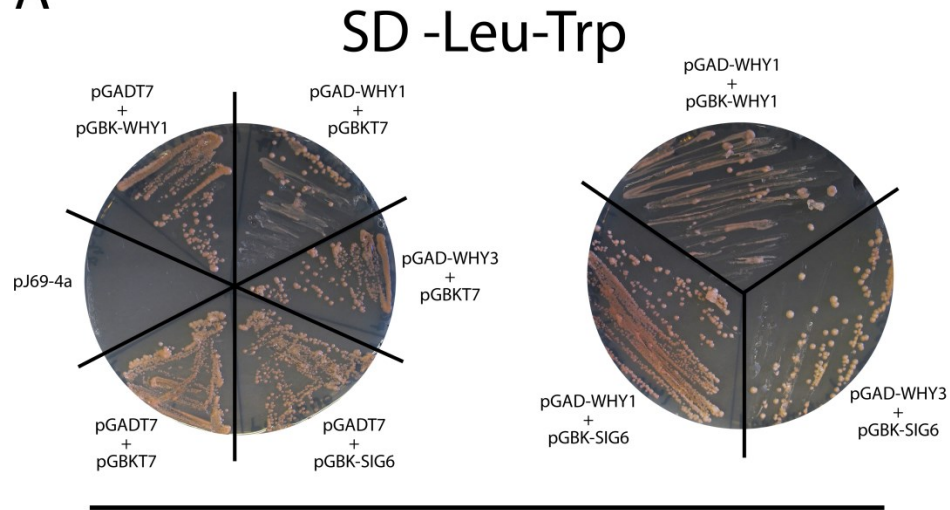
Afin de vérifier si l'absence de survie pouvait être due à l'absence d'expression de l'une ou l'autre des protéines testées, nous avons effectué une extraction des protéines totales des levures transformées afin de réaliser un immuno-buvardage de type Western avec un anticorps dirigé contre le Strep-Tag pour détecter la protéine SIG6 et un anticorps dirigé contre les protéines WHIRLY.

On remarque que l'ensemble des souches transformées avec les plasmides pGBK-SIG6 expriment bien la protéine SIG6 fusionnée avec le domaine de liaison à l'ADN (Figure

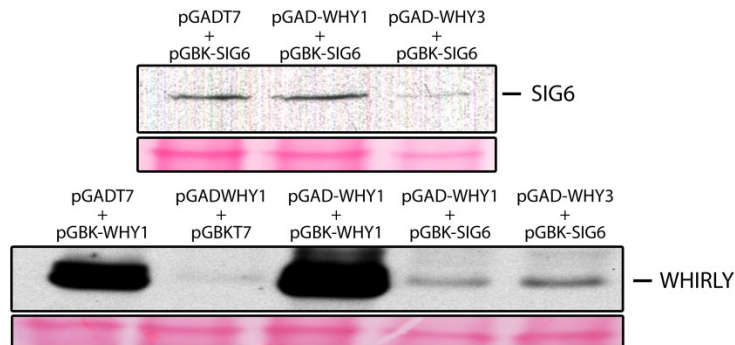
16B). Également, on remarque que les souches transformées avec les plasmides pGAD-WHY1 ou pGAD-WHY3 expriment également les protéines de fusion WHY1 ou WHY3. On peut donc dire que l'absence de survie observée est bien due à une absence d'interaction entre les protéines SIG6 et WHY1 ainsi que SIG6 et WHY3 plutôt qu'à une absence d'expression des protéines de fusion permettant la survie. Toutefois, d'autres raisons pourraient expliquer l'absence d'interaction telles qu'un rôle inhibiteur des domaines fusionnés aux protéines SIG6 et WHY1 ou WHY3 ou encore l'absence d'un partenaire nécessaire à une possible interaction.

En conclusion, ces résultats semblent suggérer que l'interaction génétique observée entre les allèles *SIG6* et *WHY1* et entre *SIG6* et *WHY3* ne serait pas due à une interaction protéique directe entre les protéines SIG6 et WHY1 ou entre SIG6 et WHY3, du moins pas par une interaction entre les domaines C-terminaux de ces protéines. Toutefois, ces résultats devraient être reconfirmés par l'utilisation d'une seconde technique, telle qu'une co-immunoprécipitation *in vitro* ou *in vivo* ou du FRET, qui permettrait de démontrer la présence ou non d'une interaction.

A



B



**Figure 16 : Absence d'interaction protéique directe entre les protéines SIG6 et WHIRLY (WHY1 ou WHY3).** (A) Croissance des différentes levures transformées avec les plasmides sur milieu minimal manquant de leucine et tryptophane (SD-Leu-Trp) et histidine et adénine (SD-Leu-Trp-His-Ade). La croissance des levures co-transformées avec les plasmides pGAD-WHY1 et pGBK-WHY1 sert de contrôle positif. (B) Immuno-buvardage de type Western dirigé contre le Strep-Tag de la construction GAD-SIG6 ou contre les protéines WHIRLY. Une bande colorée au Rouge de Ponceau sert de contrôle de chargement.

# Discussion

#### **4.1. Le mutant *sig6-3* présente un retard de croissance associé à un défaut d'expression des protéines chloroplastiques**

Dans cette étude, nous avons caractérisé une nouvelle lignée, non publiée, du mutant *sig6*. Cette lignée, *sig6-3*, présente un phénotype de cotylédons pâles, caractéristique de la perte de la protéine SIG6, associé à une déficience en chlorophylle *a* et *b*. Ce phénotype est fort probablement la conséquence d'un retard dans la biogénèse chloroplastique puisque le facteur sigma 6 est le principal facteur sigma impliqué dans ce mécanisme (Ishizaki et al., 2005; Loschelder et al., 2006). Chez le mutant *sig6-3*, on remarque que le phénotype de cotylédons pâles est présent à 4 jours mais disparaît définitivement après 10 jours. De plus, aucun phénotype n'affecte le reste de la plante. Ceci le rapproche donc plus du mutant *sig6-1* (Ishizaki et al., 2005) que du mutant *sig6-2* dont les cotylédons restent pâles tout au long du développement (Loschelder et al., 2006). Cette différence pourrait être due à l'absence d'expression, dans le mutant *sig6-1*, d'une forme alternative du transcrit *trnV*(UAC) codant pour l'ARNt-Valine, provoquant ainsi le reverdissement du mutant tandis que l'apparition de cette forme alternative semble l'empêcher chez *sig6-2* (Loschelder et al., 2006).

Le retard de biogénèse chloroplastique observé dans les mutants *sig6* est lié à l'inhibition générale de la transcription des gènes chloroplastiques de classes I (PEP-dépendants) et II (PEP et NEP-dépendants) (Ishizaki et al., 2005; Loschelder et al., 2006). Bien que le niveau de transcrits de ces gènes dans les mutants *sig6* ait été vérifié par immuno-buvardage de type Northern, l'impact sur le niveau des protéines chloroplastiques n'a été qu'une seule fois observé pour les protéines de classe I (Woodson et al., 2012). Celles-ci sont fortement sous-exprimées en cas de perte de SIG6. Nos résultats vont également dans le sens d'une diminution du niveau de protéines de classe I RBCL, PSBA et PSAA à 4 jours.

Toutefois, aucune protéine de classe II n'avait, jusqu'alors, été quantifiée dans un mutant *sig6*. Loschelder et al. ont observé que le niveau d'ARN des gènes de classe II



semble globalement similaire chez le mutant et la plante sauvage (Loschelder et al., 2006). Ils ont ainsi observé que, d'une part, la quantité de transcrits initiés à partir des promoteurs NEPs classiques sont équivalents. D'autre part, ils ont remarqué une diminution des transcrits initiés à partir des promoteurs de la PEP du fait de la diminution de son activité dans le mutant *sig6*. Finalement, il y a apparition de transcrits alternatifs, de plus haut poids moléculaire, initiés à partir de promoteurs NEPs SOS (Loschelder et al., 2006; Schweer et al., 2006). Bien que le niveau de transcrits reste le même globalement, nos résultats semblent montrer que le niveau de protéines ATPB augmente. Cela pourrait être associé à une plus grande traduction des transcrits provenant des promoteurs NEPs SOS (Schweer et al., 2006). Cela pourrait être vérifié par la quantification d'autres protéines de classe II telles que ATPE ou NDHC ainsi que de leur transcrits.

Finalement, notre étude a également permis de vérifier l'impact de la mutation *sig6* sur les niveaux de protéines à long terme. Bien que le phénotype de cotylédons pâles ait disparu après 10 jours, on remarque que le niveau de protéines chloroplastiques dans le mutant reste différent de celui de la plante de type sauvage. On remarque que les protéines RBCL et PSBA, de classe I, sont surexprimées dans le mutant *sig6-3* tandis que le niveau de la protéine ATPB, de Classe II, est plus faible après 10 jours. Toutefois, on remarque que ces différences n'ont aucun impact sur le phénotype de la plante une fois passés les premiers stades de développement. Ces résultats peuvent refléter le fait que les autres facteurs sigma ont pris le relais, avec la PEP pour la transcription de ces gènes. Cette prise de relais pourrait passer par une phase d'activation de la transcription afin de rattraper le déficit transcriptionnel des transcrits dépendant de la PEP. Comme le facteur sigma impliqué dans la transcription du gène *ATPB* est SIG6, l'expression du gène reste problématique tout au long du développement de la plante.

Nous avons donc montré que le phénotype de *sig6* est corrélé avec une diminution générale du niveau de protéines chloroplastiques, notamment de classe I, et que, bien que

le phénotype disparaisse après 10 jours, le niveau de protéines reste différent d'une plante sauvage.

#### **4.2. La perte d'une seule des deux protéines WHIRLY est bénéfique au mutant *sig6***

L'ensemble de nos résultats démontrent que la perte d'une des deux protéines WHIRLY favorise la complémentation du phénotype de cotylédons pâles du mutant *sig6*. En effet, les doubles mutants *sig6why1* et *sig6why3* présentent un phénotype proche de la plante de type sauvage. Toutefois, cette complémentation n'est pas totale puisque ces mutants conservent une déficience partielle en chlorophylle *a* et *b*. De plus, nous avons remarqué que l'expression de certaines protéines chloroplastiques, chez les doubles mutants, semble se situer entre celle du mutant *sig6* et celle de la plante de type sauvage. Ainsi, à 4 jours, la perte d'une protéine WHIRLY dans le mutant *sig6* semble compenser partiellement la sous-expression des protéines de classe I RBCL, PSBA et PSAA ainsi que la réduction de la surexpression de la protéine de classe II ATPB dans le mutant *sig6*. Ces résultats vont dans le sens d'une complémentation de l'expression des protéines chloroplastiques, se rapprochant de la plante de type sauvage, et, conséquemment, la complémentation du phénotype de cotylédons pâles dû à la mutation *sig6*. Finalement, on remarque que la perte d'une des deux WHIRLY dans le mutant *sig6* semble favoriser la complémentation de l'expression des gènes nucléaires associés à la photosynthèse (PhANGs). Cela favorise donc également la perte du phénotype de cotylédons pâles dans les doubles mutants. Ce résultat de RT-PCR semi-quantitative doit toutefois être confirmé par RT-PCR quantitative.

À 10 jours, on remarque également que le niveau d'expression des protéines chloroplastiques dans les doubles mutants se situe généralement entre celui du mutant *sig6* et celui de la plante de type sauvage. Toutefois, on remarque que l'expression de la protéine PSBA reste problématique puisqu'elle est 2.5 fois sur-exprimée dans les doubles

mutants. Cela montre que l'absence d'une protéine WHIRLY ne peut, à long terme, totalement compléter la perte de la protéine SIG6 et les multiples rôles que celle-ci peut jouer, notamment dans la régulation de la transcription du gène *PSBA* tout au long de la vie de la plante (Schweer et al., 2009; Schweer et al., 2010b).

Deux hypothèses, à priori contradictoires, peuvent expliquer le fait que l'absence d'une seule protéine WHIRLY dans le mutant *sig6* permet de favoriser la perte du phénotype ainsi que l'expression des protéines : l'activation de l'activité polymérase de la PEP ou son inhibition.

Dans la première hypothèse, l'augmentation de l'activité de la PEP associée avec un autre facteur général de transcription lors de la biogénèse permettrait de favoriser la réexpression des protéines. En effet, SIG2 est un facteur sigma qui semble avoir un rôle redondant avec la protéine SIG6 lors de la biogénèse chloroplastique (Woodson et al., 2012). L'utilisation du facteur SIG2 par la PEP, en lieu et place du facteur SIG6, pourrait permettre de favoriser l'expression normale des gènes de classe I ou II dans les doubles mutants. La perte d'une protéine WHIRLY favoriserait donc l'utilisation d'un facteur sigma alternatif ou augmenterait l'activité de la PEP. Toutefois nous ignorons le mécanisme qui permettrait cette activation.

Inversement, une inhibition de la PEP par la perte d'une des deux protéines WHIRLY pourrait favoriser l'utilisation des NEPs et ainsi permettre l'utilisation de promoteurs SOS. Dans le mutant *albostrians*, certaines parties sont vertes et possèdent la PEP tandis que d'autres parties sont blanches et n'en possèdent pas (Hess et al., 1993; Emanuel et al., 2004). En l'absence de PEP, la transcription des gènes chloroplastiques est quasiment normale du fait de l'augmentation de l'activité des NEPs sur des promoteurs SOS, non utilisés dans un contexte normal. (Legen et al., 2002; Zhelyazkova et al., 2012). On remarque d'ailleurs que l'ensemble des gènes *RBCL*, *PSBA*, *PSAA* et *ATPB* possèdent des sites de départ de la transcription dans les parties vertes ou blanches, signifiant que ces

gènes peuvent être transcrits même en l'absence de la PEP (Zhelyazkova et al., 2012). Cela avait également été observé dans le mutant *sig6* pour le gène *ATPB*, qui possède un promoteur SOS en amont afin de restaurer la transcription du gène (Schweer et al., 2006). Ce mécanisme de secours permet de favoriser l'expression normale des gènes, et, conséquemment, des protéines, en cas d'inhibition de la PEP. Zhelyazkova et al. suggèrent que ce mécanisme n'est pas automatiquement en place du fait de la forte activité de la PEP, qui est la plus abondante et active des deux types de polymérases, bloquant l'accès des promoteurs SOS aux NEPs (Zhelyazkova et al., 2012). En effet, ils ont observé que la position des promoteurs utilisés par la PEP dans un contexte normal est très proche des promoteurs SOS (Zhelyazkova et al., 2012). Dans le mutant *sig6*, la perte d'une protéine WHIRLY pourrait provoquer l'inhibition de la PEP, libérant ainsi l'accès aux promoteurs SOS par les NEPs. Cela permettrait de restaurer l'expression des gènes et, finalement, le niveau des protéines à court terme au cours de la biogénèse.

Le fait que le niveau de la protéine ATPB, dont le gène *ATPB* (classe II) est pourtant transcrit à partir d'un promoteur SOS dans le mutant *sig6* (Schweer et al., 2006), ne reste pas surexprimée dans les doubles mutants ne semble pas aller dans le sens d'une augmentation de l'utilisation des promoteurs SOS des NEPs. Toutefois, si la perte d'une protéine WHIRLY provoque l'augmentation de l'utilisation des NEPs, la plupart des gènes chloroplastiques utiliseraient, dans ce contexte, des promoteurs SOS dépendants des NEPs. Cette augmentation de l'utilisation des NEPs pourrait provoquer leur redistribution sur l'ensemble des promoteurs SOS dans le génome chloroplastique. Ainsi, le promoteur SOS du gène *ATPB*, l'un des seuls actifs dans le simple mutant *sig6*, deviendrait l'un des nombreux promoteurs SOS actifs dans les doubles mutants *sig6why1* et *sig6why3*, ce qui pourrait diminuer légèrement la transcription du gène *ATPB* et, conséquemment, la quantité de protéines ATPB dans les doubles mutants par rapport au simple mutant *sig6*.

Cette utilisation alternative des NEPs serait, plus tard dans le développement, réduite par l'utilisation normale de la PEP associée aux facteurs sigma correspondant aux

gènes à transcrire, sauf pour le gène *ATPB* qui, lui, est transcrit à l'aide de la protéine SIG6 associée à la PEP.

#### **4.3. La perte des deux protéines WHIRLY a un effet délétère sur le mutant *sig6***

Bien que la perte d'une seule protéine WHIRLY soit bénéfique pour le mutant *sig6*, on remarque que l'absence totale de protéines WHIRLY dans le mutant a peu d'effet sur celui-ci à court terme et même un effet délétère à long terme. En effet, d'une part l'absence de WHY1 et WHY3 complémente très faiblement le phénotype de cotylédons pâles du mutant *sig6*, et, d'autre part, on remarque que, à 4 jours, bien que l'expression de certaines protéines telles que RBCL ou PSAA soit rétablie, l'expression d'autres protéines telles que ATPB ou PSBA est encore problématique. L'expression des gènes nucléaires associés à la photosynthèse reste également faible comme dans le mutant *sig6*. Après 10 jours de développement, la perte des deux WHIRLY dans le mutant *sig6* provoque l'apparition d'un phénotype persistant. Celui-ci se limite aux parties inférieures des jeunes vraies feuilles, soit la partie correspondant au méristème. Cette partie de la feuille correspond également à l'endroit où se fait la biogénèse chloroplastique dans les vraies feuilles. Finalement, on remarque que l'expression des protéines chloroplastiques dans le triple mutant reste, après 10 jours, très anormale, même comparée au simple mutant *sig6*, certaines protéines étant surexprimées (PSBA et PSAA) et d'autres sous-exprimées (RBCL et ATPB). Ces résultats démontrent que l'homéostasie protéique dans les chloroplastes du triple mutant *sig6why1why3* est compromise. Cela expliquerait l'apparition d'un phénotype persistant lors du développement de la plante.

Contrairement à ce que suggéraient Loschelder et al., dont le modèle ne prédit pas de rôle pour la protéine SIG6 dans la biogénèse des chloroplastes des vraies feuilles (Loschelder et al., 2006), nos résultats suggèrent que la protéine SIG6, en association avec les protéines WHY1 et WHY3, a un rôle important à jouer dans le passage du proplastide au chloroplaste photosynthétique dans les vraies feuilles.

Étant donnée la grande similarité entre les protéines WHY1 et WHY3, il n'est pas anormal de voir apparaître un impact plus important sur le phénotype du mutant *sig6* lors de l'absence des deux protéines comparativement aux doubles mutants *sig6why1* et *sig6why3*. Ces résultats ne peuvent toutefois s'expliquer par notre première hypothèse stipulant que l'absence d'une protéine WHIRLY favorise l'augmentation de l'activité de la PEP. En effet, selon cette hypothèse, nous nous attendrions à ce que l'absence des deux protéines favorise d'autant plus l'utilisation de la PEP et, finalement, la complémentation totale du phénotype du mutant *sig6*.

Cependant, notre seconde hypothèse selon laquelle l'absence d'une protéine WHIRLY inhibe la PEP peut également expliquer les résultats observés dans le triple mutant. En effet, la disparition des deux WHIRLY provoquerait une forte et durable inhibition de la PEP, empêchant également son activité avec un autre facteur sigma, compromettant ainsi la complémentation du phénotype de *sig6*. Malgré l'activation et l'utilisation des promoteurs SOS des NEPs, la complémentation serait inefficace à long terme à cause de l'inhibition trop forte de la PEP et l'absence de régulation de la transcription chloroplastique par la PEP associée aux facteurs sigma. En effet, l'association des facteurs sigmas avec la PEP permet de réguler finement la transcription chloroplastique, que cela soit en régulant la quantité de protéines dans le photosystème I et II par l'intermédiaire de SIG1 (Tozawa et al., 2007; Puthiyaveetil et al., 2008; Puthiyaveetil et al., 2010; Hanaoka et al., 2012), ou en répondant aux signaux environnementaux par l'intermédiaire de SIG5 (Nagashima et al., 2004). De plus, Zhelyazkova et al. suggèrent que, dans le mutant *albostrians*, l'utilisation des promoteurs SOS par les NEPs ne permettent pas de compléter le phénotype du mutant du fait que certains gènes, qui pourraient être essentiels à la biogénèse, ne possèdent pas de promoteurs SOS, rendant ainsi indispensable une activité, même faible, de la PEP (Zhelyazkova et al., 2012). Dans le triple mutant *sig6why1why3*, l'augmentation de l'utilisation des NEPs au détriment de la PEP aurait ainsi, au cours de la vie de la plante, des

effets néfastes malgré le faible bénéfice qu'elle amènerait dès les premiers stades de développement.

De plus, la demande de transcription de l'ensemble des gènes chloroplastiques par les NEPs seulement se ferait au détriment des gènes de classe III. En effet, les NEPs ne pourraient, à elles seules, assurer la transcription de tous les gènes chloroplastiques, provoquant alors l'apparition d'un phénotype persistant et la transcription anormale de l'ensemble des gènes de classes I, II et III. Afin de le tester, il faudra vérifier l'expression des transcrits de classe I, II mais surtout III notamment par immuno-buvardage de type Northern dans un mutant *why1why3sig6* et le comparer aux mutants *sig6*, *why1sig6* et *why3sig6*. Cela permettra ainsi de vérifier si les gènes de classe III sont transcrits moins efficacement tel que prédit dans notre hypothèse.

#### **4.4. Les protéines WHIRLY sont impliquées dans la biogénèse chloroplastique**

Cette étude permet d'établir un lien clair entre les protéines WHIRLY et la biogénèse chloroplastique. En effet, nos résultats démontrent que l'interaction génétique entre l'allèle *SIG6* et les allèles *WHY1* et *WHY3* a un rôle biologique lors de la biogénèse. D'une part, l'absence d'une seule des deux protéines WHIRLY favorise, dans un mutant *sig6*, le développement du proplastide vers un chloroplaste chlorophyllien, capable de photosynthèse. D'autre part, on remarque que l'absence des deux protéines WHIRLY, dans un mutant *sig6*, compromet grandement la biogénèse chloroplastique au niveau des cotylédons mais également au niveau des vraies feuilles. Ce résultat vient supporter la conclusion de l'étude de Prikryl et al. qui montre que l'absence de la seule protéine WHIRLY présente dans les chloroplastes du maïs compromet la biogénèse chloroplastique (Prikryl et al., 2008).

Récemment, il a été montré que la perte de la protéine SP1, une ligase d'ubiquitine E3, permettant la dégradation des protéines par le protéasome, impliquée dans la

biogénèse chloroplastique et notamment dans la transition entre proplastide et chloroplaste, permet de compléter le retard de biogénèse observé dans un mutant sans protéine TOC (Translocon at the Outer envelope of Chloroplasts), responsable de l'importation des protéines dans le chloroplaste (Ling et al., 2012). Cela démontre que la perte de deux protéines impliquées dans la biogénèse chloroplastique peut permettre de la rétablir.

Les deux protéines WHIRLY ont plus de 78% d'identité. Elles partagent également un rôle redondant dans le maintien de la stabilité génomique (Maréchal et al., 2009). Ici, on remarque que leur fonction dans la biogénèse chloroplastique est également redondante. En effet, la perte de WHY1 ou de WHY3 a le même effet sur la complémentation du phénotype de *sig6* et la perte du retard de biogénèse. De plus, c'est la perte des deux protéines qui provoque l'augmentation du retard de biogénèse.

Le fait que la perte des deux protéines WHY1 et WHY3, dans un double mutant *why1why3*, ne provoque pas de phénotype visible associé à un retard de biogénèse chloroplastique semble toutefois démontrer que les WHIRLY ne sont pas essentiels pour la biogénèse chloroplastique.

#### **4.5. Le rôle dans le maintien de la stabilité génomique des protéines WHIRLY ne semble pas être à l'origine de leur rôle dans la biogénèse chloroplastique**

Les protéines WHIRLY sont impliquées dans le maintien de la stabilité génomique du chloroplaste en défavorisant l'apparition de réarrangements génomiques chloroplastiques (Maréchal et al., 2009; Cappadocia et al., 2010; Cappadocia et al., 2012). Toutefois, il semble que le retard de biogénèse chloroplastique observé chez le triple mutant *sig6why1why3* ne provienne pas de ce rôle des protéines WHIRLY. En effet, le



triple mutant *sig6why1why3* n'accumule que peu de réarrangements génomiques chloroplastiques. De plus, les doubles mutants *sig6why1* et *sig6why3* accumulent autant de réarrangements qu'une plante de type sauvage ou qu'un mutant *sig6*. Ceci supporte donc le fait que l'apparition des réarrangements ne favorise pas la complémentation du phénotype chez les doubles mutants ou l'apparition d'un phénotype persistant chez le triple mutant.

On remarque que les triples mutants *sig6why1why3* contiennent moins de réarrangements génomiques chloroplastiques comparativement au double mutant *why1why3*. Cela pourrait résulter de l'inhibition de la transcription causée par la mutation *sig6*. En effet, la transcription provoque l'apparition de boucles R (R-Loop), constituées d'un long brin d'ADN simple-brin (Kim and Jinks-Robertson, 2012). Ce brin est plus susceptible aux dommages tels que les bris ou la recombinaison non-homologue. De plus, les rencontres entre l'ARN polymérase et l'ADN polymérase peuvent également causer un effondrement des fourches de réplication et l'apparition de bris doubles-brins (Kim and Jinks-Robertson, 2012). Bien qu'un lien entre la transcription et la stabilité génomique n'ait jamais été clairement établi dans le chloroplaste, il y a fort à parier que les observations faites dans les bactéries puissent également survenir dans le chloroplaste.

Alternativement, il est possible que la mutation *sig6* et le problème général du PGE observé dans le triple mutant provoque, par l'intermédiaire de la signalisation rétrograde, la surexpression de gènes nucléaires encodant pour des protéines impliquées dans le maintien de la stabilité génomique. En effet, parmi les 500 gènes les plus surexprimés dans un mutant *sig6*, au moins neuf d'entre eux pourraient avoir un rôle dans la réparation de l'ADN tels que *BRCA1*, *RECA2*, *WHY2* ou *RAD50* (Tableau supplémentaire S6 (Woodson et al., 2012)). La surexpression de ces gènes provoquée par la mutation *sig6* pourrait donc favoriser, de par leur rôle, le maintien de la stabilité génomique chloroplastique en cas de présence de cette mutation tel que dans le mutant *why1why3sig6*.

#### **4.6. Une interaction directe entre les protéines WHIRLY et SIG6 n'explique pas le rôle des protéines WHIRLY dans la biogénèse chloroplastique**

La protéine DG1 (DELAYED GREENING 1) est impliquée dans la transcription et la biogénèse chloroplastique. Les auteurs suggèrent que son interaction avec SIG6, par l'intermédiaire de sa partie C-terminale, pourrait permettre de stabiliser la liaison de SIG6 à l'ADN sur les promoteurs dépendants de SIG6 ou encore de stabiliser l'interaction entre SIG6 et la PEP (Chi et al., 2010). Dans notre cas, il ne semble pas que l'interaction génétique provienne d'une interaction protéique directe entre SIG6 et WHIRLY, du moins pas par leur extrémité C-terminale. En effet, l'expérience de double-hybride en levure réalisée dans cette étude ne démontre pas l'existence d'une telle interaction bien qu'on ne puisse conclure à son inexistence.

Ce résultat est donc en contradiction avec le criblage effectué précédemment au laboratoire dans lequel la protéine SIG6 semblait interagir avec la protéine WHY1. Toutefois, celui-ci avait pour but de mettre en évidence les protéines, fusionnées, à leur extrémité C-terminale, avec le domaine de trans-activation de GAL4 (AD), capable d'interagir avec la protéine WHY1, fusionnée quant à elle, à son extrémité N-terminale, au domaine de liaison à l'ADN de GAL4 (DBD). Les deux clones retrouvés dans ce criblage double-hybride exprimaient donc la protéine SIG6 fusionnée, à son extrémité C-terminale, avec le domaine de trans-activation de la protéine GAL4 (SIG6-AD). Dans notre cas, les constructions ont été inversées puisque c'est la protéine WHY1 qui est fusionnée avec le domaine de trans-activation (WHY1-AD) et la protéine SIG6, quant à elle, est fusionnée avec le domaine de fixation à l'ADN (SIG6-DBD). Cette différence pourrait être à l'origine de la différence dans les résultats obtenus. Toutefois, du fait de l'interaction entre la protéine SIG6 et les promoteurs de type bactérien, le résultat obtenu précédemment au laboratoire pouvait également provenir d'une interaction non spécifique ADN-protéine entre le domaine de liaison à l'ADN de SIG6 (domaine C-terminal de SIG6) et les promoteurs permettant la synthèse d'acides aminés, permettant ensuite l'activation de leur transcription par l'intermédiaire du domaine de trans-activation de GAL4 dans la

construction SIG6-AD utilisée alors. Ainsi, les résultats obtenus précédemment peuvent provenir de faux positifs plutôt que de l'interaction entre les protéines SIG6-AD et DBD-WHY1.

Bien que l'expérience de double-hybride n'ait fait ressortir aucune interaction entre les protéines WHIRLY et l'extrémité N-terminale de la protéine SIG6, on ne peut exclure qu'une telle interaction puisse se réaliser *in vivo*. Des expériences complémentaires telles qu'une co-immunoprécipitation *in vitro* ou *in vivo* ou encore une expérience de FRET pourrait permettre de clarifier cette question.

#### **4.7. Une légère inhibition de la PEP provoque la complémentation du mutant *sig6***

Afin de tester notre hypothèse selon laquelle une inhibition de la PEP pourrait permettre de compléter le phénotype de cotylédons pâles de *sig6*, nous avons traité les lignées mutantes *sig6-3* et *sig6-1* avec des doses croissantes de rifampicine. La rifampicine est utilisée afin d'inhiber spécifiquement la PEP du fait de la similarité entre la PEP et l'ARN polymérase bactérienne. Nos résultats montrent qu'un traitement à des doses faibles de rifampicine, ne provoquant aucun phénotype sur la plante de type sauvage, est capable de compléter le phénotype de *sig6* de manière dose-dépendante. Toutefois, cette complémentation ne survient qu'à faible dose et n'est pas retrouvée lors d'un traitement à haute-dose. Cette complémentation s'apparente à la complémentation observée dans un mutant *sig6why1* et *sig6why3*. Cela appuie donc notre hypothèse selon laquelle la complémentation par la perte d'un WHIRLY pourrait provenir de l'inhibition partielle de la PEP et ainsi permettre la perte du phénotype de *sig6*.

Selon notre hypothèse, la perte des deux protéines WHIRLY provoquerait l'inhibition totale de la PEP, entraînant l'apparition du phénotype persistant. On remarque, d'une part, qu'en traitant les mutants *sig6* avec une dose forte de rifampicine, les plantes sont grandement affectées, et même incapables de germer. On en déduit donc que seule

une légère inhibition de la PEP peut permettre la complémentation du phénotype de *sig6*. Les doubles mutants *sig6why1* et *sig6why3* ont également été traités avec des doses faibles de rifampicine. Selon notre hypothèse, la perte d'un WHIRLY entraîne une faible inhibition de la PEP. Si on ajoute à cela un traitement à la rifampicine, on aura une forte inhibition de la PEP due à un effet additif. Ce traitement mimerait donc la perte du deuxième WHIRLY dans les doubles mutants et serait comparable au triple mutant *sig6why1why3*. On remarque en effet que ce traitement provoque, sur les doubles mutants, l'apparition du même phénotype persistant sur les vraies feuilles que le triple mutant. Cela supporte donc notre hypothèse puisque cela signifie que le triple mutant s'apparente à un double mutant avec une plus forte inhibition de la PEP, provoquant alors un effet délétère sur le mutant *sig6*.

#### **4.8. Les protéines WHIRLY pourraient être importantes pour le maintien de l'activité de la PEP**

Nous proposons ici un modèle selon lequel la perte des protéines WHIRLY provoque une inhibition de la PEP (Figure 17). Dans celui-ci, la perte d'une des deux protéines inhibe partiellement son activité alors que la perte des deux protéines provoque une plus forte inhibition de la PEP. Ce modèle est corroboré par la quantification des protéines dans les doubles mutants *sig6why1* et *sig6why3* ainsi que dans les triple mutants *sig6why1why3* et également par le traitement des mutants *sig6*, *sig6why1* et *sig6why3* à la rifampicine.

Dans ce modèle, nous suggérons que les protéines WHY1 et WHY3 sont importantes, *in vivo*, pour le maintien de l'activité de la PEP, au moins dans un mutant *sig6*, au cours de la biogénèse chloroplastique.

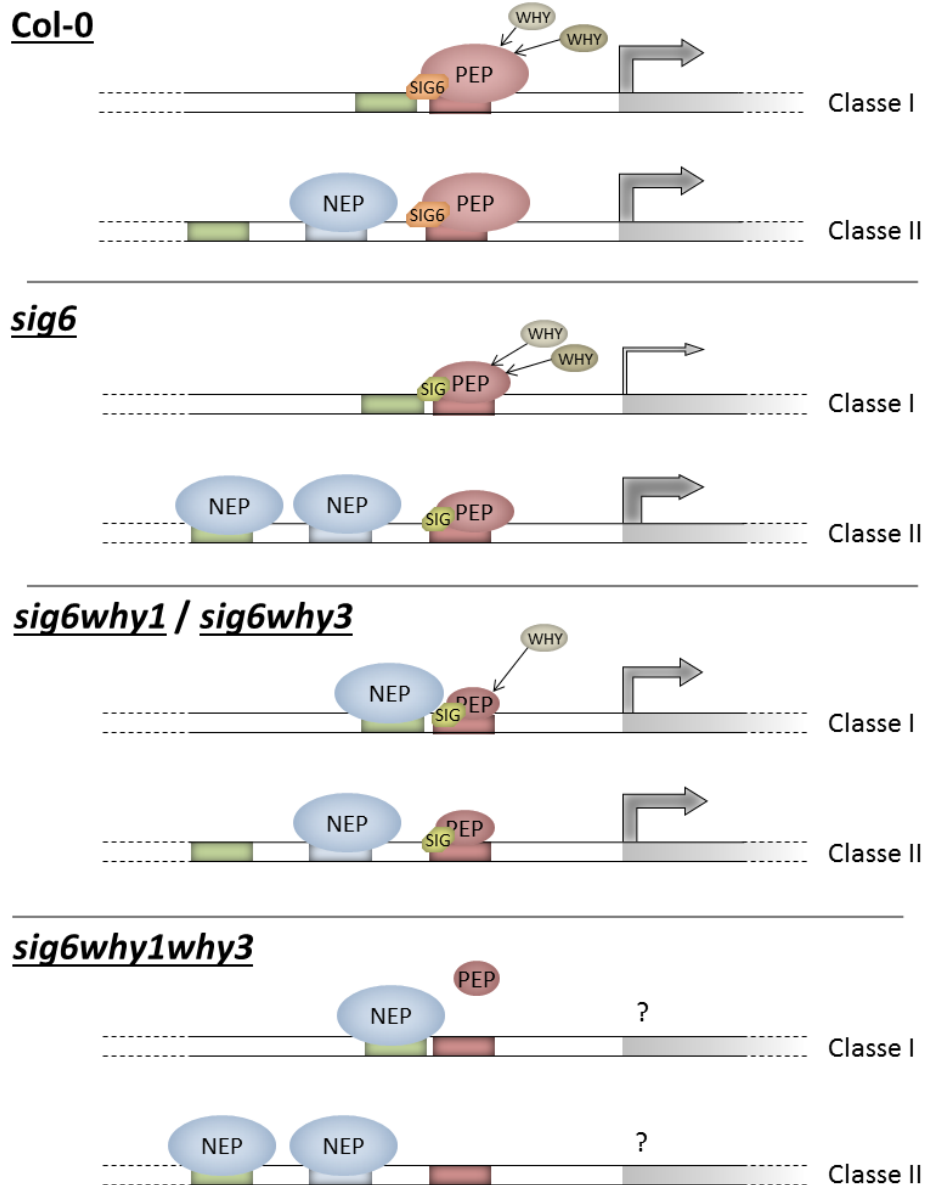
- Au cours de la biogénèse chloroplastique dans la plante de type sauvage Col-0, l'activité de la PEP est normale (Figure 17). Les gènes de classe I sont donc transcrits par la PEP en association avec SIG6. Les gènes de classe II sont, quant à eux, transcrits par la PEP-SIG6 sur les promoteurs de la PEP et par les NEPs sur les promoteurs réguliers de la NEP.
- Dans un mutant *sig6*, l'activité de la PEP est inhibée au cours de la biogénèse (Figure 17). Toutefois, un autre facteur sigma général (e.g. SIG2) peut permettre de compenser la perte du facteur SIG6 bien que de manière moins efficace. Les NEPs transcrivent toutefois efficacement les gènes de classe II par l'intermédiaire des promoteurs réguliers de NEPs ou de la PEP ou de l'activation des promoteurs SOS. La diminution marquée de la transcription des gènes de classe I entraînerait un retard de biogénèse chloroplastique et, conséquemment, l'apparition du phénotype de cotylédons pâles.
- En cas de perte d'une des deux protéines WHIRLY dans un mutant *sig6*, l'activité de la PEP serait d'autant plus réduite (Figure 17). Toutefois, cela permettrait l'activation des promoteurs SOS qui étaient masqués par l'activité de la PEP en association avec un facteur sigma général de secours sur les gènes de classe I. Les gènes de classe I seraient alors transcrits plus efficacement, bien que moins que dans la plante de type sauvage. Une redistribution générale des NEPs sur les promoteurs SOS réduirait également l'expression des gènes de classe II par rapport au mutant *sig6*. Cela entraînerait l'expression quasiment normale des protéines chloroplastiques et, conséquemment, la perte du phénotype de cotylédons pâles.
- Finalement, la perte des deux WHIRLY entraînerait une très forte inhibition de la PEP. Seules les NEPs seraient chargées d'exprimer les gènes possédant des promoteurs SOS, soit la quasi-totalité des gènes chloroplastiques (Figure 17). Cela entraînerait l'expression anormale des gènes chloroplastiques puisque l'activité

régulatrice de la PEP serait perdue ou bien du fait de l'absence de promoteurs SOS sur certains gènes. Également, cela pourrait résulter d'une demande trop grande de transcription par les NEPs, incapables de prendre le relais de la transcription pour l'ensemble des gènes chloroplastiques. L'homéostasie protéique du triple mutant serait alors fortement compromise, entraînant l'apparition d'un phénotype persistant.

Le rôle exact des protéines WHIRLY dans le maintien de l'activité de la PEP reste toutefois à déterminer. Les protéines WHIRLY pourraient être directement impliquées dans la transcription. En effet, elles sont toutes les deux retrouvées dans le PTAC et semblent donc avoir un rôle à jouer dans la machinerie transcriptionnelle (Pfalz et al., 2006). Toutefois, ce rôle ne semble pas essentiel pour deux raisons : d'une part les deux protéines WHIRLY ne sont pas retrouvées dans l'étude de Steiner et al. qui montre que seules 10 protéines sont indispensables au fonctionnement de la polymérase PEP (Steiner et al., 2011). De plus, Steiner et al. ont montré que la perte de protéines impliquées directement dans la transcription provoque presque toujours l'apparition d'un phénotype albinos ou de cotylédons pâles (Steiner et al., 2011). Le double mutant *why1why3* ne présente, quant à lui, aucun phénotype dans les premiers stades du développement, laissant sous-entendre que les WHIRLY ne seraient pas impliquées directement dans la transcription. Toutefois, dans notre étude, on a pu constater que le double mutant *why1why3* présente des niveaux d'expression des protéines chloroplastique anormaux. La perte des protéines WHY1 et WHY3 semble donc avoir un impact sur l'expression des protéines chloroplastiques.

En 2004, une étude a montré qu'une protéine SSB (Single-Strand Binding protein), capable de fixer l'ADN simple brin de manière non spécifique et impliquée dans les mécanismes de réparation de l'ADN, permet, chez les archées, de favoriser l'activité de l'ARN polymérase (Richard et al., 2004). Les auteurs montrent que cette protéine peut interagir avec la polymérase et favoriser son recrutement aux promoteurs ainsi que

l'initiation de la transcription. Également, l'ajout de la protéine SSB dans un essai transcriptionnel *in vitro* permet de favoriser la transcription même en l'absence d'un facteur de transcription en principe indispensable pour la transcription. Les auteurs suggèrent que la protéine SSB favorise la déstabilisation de l'ADN double-brin et le recrutement de la polymérase au niveau des promoteurs à l'aide de son extrémité C-terminale (Richard et al., 2004). Étant donné la similarité de fonction entre les deux protéines WHIRLY et la protéine SSB, il est tentant de proposer le même rôle pour WHY1 et WHY3 en association avec la PEP. Cette hypothèse pourrait notamment être testée en effectuant une expérience de co-immunoprécipitation *in vitro* entre le complexe PEP (RPOA, RPOB, RPOC1 et RPOC2) et les protéines WHY1 et WHY3. De plus, un essai transcriptionnel sur un plasmide de type bactérien à l'aide de la PEP purifiée pourrait permettre de vérifier si la présence d'une ou des deux protéines WHIRLY pourrait favoriser l'activité transcriptionnelle de la PEP.



**Figure 17 : Modèle décrivant l'activité de la PEP et des NEPs dans les différents mutants et l'impact sur la transcription des gènes de classe I et II.** Les carrés verts, bleus et rouges représentent respectivement les promoteurs SOS, de NEPs réguliers et de la PEP en amont d'un gène. Les ovales bleus et rouges représentent respectivement la NEP et la PEP. L'activité relative de la polymérase PEP est représentée par la taille de l'ovale rouge. La forme orange représente la protéine SIG6 tandis que la forme jaune représente un facteur sigma général (e.g. SIG2). La zone grisée représente la séquence transcrite du gène. La grosseur de la flèche représente le niveau de transcription relatif du gène. Des points d'interrogation (?) signifient que le niveau de transcription est anormal sans toutefois qu'une tendance particulière se dégage. Finalement les ovales gris et bruns représentent les protéines WHIRLY. La classe du gène est écrite à droite du schéma qui le représente. Les flèches noires représenteraient un mécanisme d'activation direct ou indirect.



Alternativement, le rôle des protéines WHIRLY dans le métabolisme de l'ARN et notamment dans la biogénèse des ribosomes pourrait également expliquer l'augmentation des NEPs et la diminution de l'activité de la PEP. En effet, Prikryl et al. ont montré qu'un mutant *why1* dans le maïs présente une déficience en ribosome plastidique (Prikryl et al., 2008). Selon les auteurs, cette déficience proviendrait de la diminution de la biogénèse d'ARN ribosomique. Or, en utilisant le mutant *albostrians* de l'orge, qui présente également une déficience en ribosome plastidique, Emmanuel et al. ont montré que l'absence de ribosome provoque la surexpression de la NEP (Emmanuel et al., 2004). Les auteurs suggèrent que l'absence de ribosome favorise un signal rétrograde du chloroplaste au noyau, activant l'expression de la NEP. Conséquemment, la NEP augmenterait la transcription du gène chloroplastique *RPOB* et donc le niveau de PEP. Toutefois, la plante étant déficiente en ribosome, l'ARNm de *RPOB* n'est pas traduit, provoquant alors une déficience en PEP (Hess et al., 1993; Emmanuel et al., 2004). Ainsi, dans ce mutant, l'activité polymérase de la NEP augmente tandis que l'activité polymérase de la PEP diminue. Dans le mutant *sig6*, la perte des WHIRLY pourrait provoquer une diminution du niveau de ribosome plastidique, favorisant ainsi la signalisation rétrograde et finalement l'augmentation de l'activité des NEPs au détriment de l'activité de la PEP.

#### **4.9. Conclusion et Perspectives**

L'ensemble de nos résultats montre donc que les protéines WHIRLY jouent un rôle dans la biogénèse chloroplastique, au moins en association avec la protéine SIG6. Ce rôle s'avère important biologiquement puisque l'absence d'une des deux protéines permet de rétablir une biogénèse normale dans un mutant *sig6* tandis que l'absence des deux s'avère néfaste pour le développement normal du mutant. Nous proposons également un modèle permettant d'expliquer comment la perte des protéines WHIRLY dans le mutant *sig6* peut avoir un impact sur l'expression des gènes chloroplastiques et, conséquemment, sur la biogénèse chloroplastique. Dans notre modèle, la perte des protéines WHIRLY provoque la

diminution de l'activité de la PEP et l'augmentation de l'utilisation des promoteurs SOS des NEPs. Ceci permet d'expliquer le phénotype des différents mutants ainsi que les niveaux de protéines chloroplastiques observés. Finalement, nous proposons deux hypothèses permettant de faire le lien entre les protéines WHIRLY et l'activation de la PEP : un rôle direct des WHIRLY dans la transcription en association avec la PEP ou un rôle indirect dans la biogénèse des ribosomes plastidiques.

Il serait intéressant, dans l'avenir, de vérifier directement les niveaux d'ARN des gènes chloroplastiques par immuno-buvardage de type Northern et par séquençage haut-débit d'ARN dans les différents mutants afin de vérifier l'impact de l'absence des WHIRLY sur la quantité ainsi que la nature des transcrits des gènes chloroplastiques. En effet, cela permettra de vérifier si des promoteurs alternatifs SOS sont utilisés pour la transcription de la plupart des gènes dans un mutant *sig6why1why3*, comme le prédit notre modèle. De plus, l'effet de l'absence des deux WHIRLY sur la transcription des gènes chloroplastiques pourra être vérifié par cette méthode, permettant ainsi de vérifier si les NEPs seules sont capables de transcrire le génome chloroplastique et notamment les gènes de classe III. Également, la quantification du niveau de protéines RPOA, RPOB, RPOC1 et RPOC2 permettrait de vérifier l'impact de l'absence des protéines WHIRLY sur la quantité de PEP. Un essai de transcription *in vitro* avec l'ARN polymérase d'*E. coli* pourrait également permettre de vérifier si les protéines WHIRLY, en association avec SIG6 sont capables de favoriser l'activité d'une ARN polymérase de type bactérienne. Un croisement entre les mutants *why1why3* et *sig2*, qui présente également un phénotype dès les premiers stades de développement pourrait permettre de vérifier si la complémentation de la biogénèse chloroplastique par la perte des WHIRLY est uniquement observable dans un mutant *sig6*. Finalement, il serait intéressant de vérifier si l'extrémité C-terminale des WHIRLY ou leur capacité à former un tétramère et un 24-mère a un rôle à jouer dans leur fonction dans la biogénèse chloroplastique. Pour finir, afin de vérifier si la complémentation ou l'aggravation du phénotype par la perte des WHIRLY implique la signalisation rétrograde, il

serait intéressant de croiser les mutants avec le mutant *gun1*, qui empêche la signalisation au noyau.

# Bibliographie

- Arsova, B., Hoja, U., Wimmelbacher, M., Greiner, E., Ustun, S., Melzer, M., Petersen, K., Lein, W., and Bornke, F.** (2010). Plastidial thioredoxin z interacts with two fructokinase-like proteins in a thiol-dependent manner: evidence for an essential role in chloroplast development in *Arabidopsis* and *Nicotiana benthamiana*. *The Plant cell* **22**, 1498-1515.
- Asada, K.** (2006). Production and scavenging of reactive oxygen species in chloroplasts and their functions. *Plant physiology* **141**, 391-396.
- Baumgartner, B.J., Rapp, J.C., and Mullet, J.E.** (1989). Plastid transcription activity and DNA copy number increase early in barley chloroplast development. *Plant physiology* **89**, 1011-1018.
- Beardslee, T.A., Roy-Chowdhury, S., Jaiswal, P., Buhot, L., Lerbs-Mache, S., Stern, D.B., and Allison, L.A.** (2002). A nucleus-encoded maize protein with sigma factor activity accumulates in mitochondria and chloroplasts. *The Plant journal : for cell and molecular biology* **31**, 199-209.
- Bellafiore, S., Barneche, F., Peltier, G., and Rochaix, J.D.** (2005). State transitions and light adaptation require chloroplast thylakoid protein kinase STN7. *Nature* **433**, 892-895.
- Campbell, E.A., Korzheva, N., Mustaev, A., Murakami, K., Nair, S., Goldfarb, A., and Darst, S.A.** (2001). Structural mechanism for rifampicin inhibition of bacterial rna polymerase. *Cell* **104**, 901-912.
- Cappadocia, L., Marechal, A., Parent, J.S., Lepage, E., Sygusch, J., and Brisson, N.** (2010). Crystal structures of DNA-Whirly complexes and their role in *Arabidopsis* organelle genome repair. *The Plant cell* **22**, 1849-1867.
- Cappadocia, L., Parent, J.S., Zampini, E., Lepage, E., Sygusch, J., and Brisson, N.** (2012). A conserved lysine residue of plant Whirly proteins is necessary for higher order protein assembly and protection against DNA damage. *Nucleic acids research* **40**, 258-269.
- Chi, W., Mao, J., Li, Q., Ji, D., Zou, M., Lu, C., and Zhang, L.** (2010). Interaction of the pentatricopeptide-repeat protein DELAYED GREENING 1 with sigma factor SIG6 in the regulation of chloroplast gene expression in *Arabidopsis* cotyledons. *The Plant journal : for cell and molecular biology* **64**, 14-25.
- Coll, N.S., Danon, A., Meurer, J., Cho, W.K., and Apel, K.** (2009). Characterization of soldat8, a suppressor of singlet oxygen-induced cell death in *Arabidopsis* seedlings. *Plant & cell physiology* **50**, 707-718.
- Demarsy, E., Courtois, F., Azevedo, J., Buhot, L., and Lerbs-Mache, S.** (2006). Building up of the plastid transcriptional machinery during germination and early plant development. *Plant physiology* **142**, 993-1003.
- Desveaux, D., Marechal, A., and Brisson, N.** (2005). Whirly transcription factors: defense gene regulation and beyond. *Trends in plant science* **10**, 95-102.
- Desveaux, D., Despres, C., Joyeux, A., Subramaniam, R., and Brisson, N.** (2000). PBF-2 is a novel single-stranded DNA binding factor implicated in PR-10a gene activation in potato. *The Plant cell* **12**, 1477-1489.

- Desveaux, D., Subramaniam, R., Despres, C., Mess, J.N., Levesque, C., Fobert, P.R., Dangl, J.L., and Brisson, N.** (2004). A "Whirly" transcription factor is required for salicylic acid-dependent disease resistance in Arabidopsis. *Developmental cell* **6**, 229-240.
- Donnelly, P.M., Bonetta, D., Tsukaya, H., Dengler, R.E., and Dengler, N.G.** (1999). Cell cycling and cell enlargement in developing leaves of Arabidopsis. *Developmental biology* **215**, 407-419.
- Dyall, S.D., Brown, M.T., and Johnson, P.J.** (2004). Ancient invasions: from endosymbionts to organelles. *Science* **304**, 253-257.
- Emanuel, C., Weihe, A., Graner, A., Hess, W.R., and Borner, T.** (2004). Chloroplast development affects expression of phage-type RNA polymerases in barley leaves. *The Plant journal : for cell and molecular biology* **38**, 460-472.
- Favory, J.J., Kobayshi, M., Tanaka, K., Peltier, G., Kreis, M., Valay, J.G., and Lerbs-Mache, S.** (2005). Specific function of a plastid sigma factor for *ndhF* gene transcription. *Nucleic acids research* **33**, 5991-5999.
- Fernandez, A.P., and Strand, A.** (2008). Retrograde signaling and plant stress: plastid signals initiate cellular stress responses. *Current opinion in plant biology* **11**, 509-513.
- Fujiwara, M., Nagashima, A., Kanamaru, K., Tanaka, K., and Takahashi, H.** (2000). Three new nuclear genes, *sigD*, *sigE* and *sigF*, encoding putative plastid RNA polymerase sigma factors in *Arabidopsis thaliana*. *FEBS letters* **481**, 47-52.
- Gao, Z.P., Yu, Q.B., Zhao, T.T., Ma, Q., Chen, G.X., and Yang, Z.N.** (2011). A functional component of the transcriptionally active chromosome complex, *Arabidopsis* pTAC14, interacts with pTAC12/HEMERA and regulates plastid gene expression. *Plant physiology* **157**, 1733-1745.
- Gilkerson, J., Perez-Ruiz, J.M., Chory, J., and Callis, J.** (2012). The plastid-localized pfkB-type carbohydrate kinases FRUCTOKINASE-LIKE 1 and 2 are essential for growth and development of *Arabidopsis thaliana*. *BMC plant biology* **12**, 102.
- Grabowski, E., Miao, Y., Mulisch, M., and Krupinska, K.** (2008). Single-stranded DNA-binding protein Whirly1 in barley leaves is located in plastids and the nucleus of the same cell. *Plant physiology* **147**, 1800-1804.
- Green, B.R.** (2011). Chloroplast genomes of photosynthetic eukaryotes. *The Plant journal : for cell and molecular biology* **66**, 34-44.
- Gutierrez-Nava Mde, L., Gillmor, C.S., Jimenez, L.F., Guevara-Garcia, A., and Leon, P.** (2004). CHLOROPLAST BIOGENESIS genes act cell and noncell autonomously in early chloroplast development. *Plant physiology* **135**, 471-482.
- Hajdukiewicz, P.T., Allison, L.A., and Maliga, P.** (1997). The two RNA polymerases encoded by the nuclear and the plastid compartments transcribe distinct groups of genes in tobacco plastids. *The EMBO journal* **16**, 4041-4048.
- Hanaoka, M., Kato, M., Anma, M., and Tanaka, K.** (2012). SIG1, a Sigma Factor for the Chloroplast RNA Polymerase, Differently Associates with Multiple DNA Regions in the Chloroplast Chromosomes in Vivo. *International Journal of Molecular Sciences* **13**, 12182-12194.

- Hanaoka, M., Kanamaru, K., Fujiwara, M., Takahashi, H., and Tanaka, K.** (2005). Glutamyl-tRNA mediates a switch in RNA polymerase use during chloroplast biogenesis. *EMBO reports* **6**, 545-550.
- Hedtke, B., Borner, T., and Weihe, A.** (2000). One RNA polymerase serving two genomes. *EMBO reports* **1**, 435-440.
- Hedtke, B., Meixner, M., Gillandt, S., Richter, E., Borner, T., and Weihe, A.** (1999). Green fluorescent protein as a marker to investigate targeting of organellar RNA polymerases of higher plants in vivo. *The Plant journal : for cell and molecular biology* **17**, 557-561.
- Hess, W.R., Prombona, A., Fieder, B., Subramanian, A.R., and Borner, T.** (1993). Chloroplast rps15 and the rpoB/C1/C2 gene cluster are strongly transcribed in ribosome-deficient plastids: evidence for a functioning non-chloroplast-encoded RNA polymerase. *The EMBO journal* **12**, 563-571.
- Hricova, A., Quesada, V., and Micol, J.L.** (2006). The SCABRA3 nuclear gene encodes the plastid RpoTp RNA polymerase, which is required for chloroplast biogenesis and mesophyll cell proliferation in Arabidopsis. *Plant physiology* **141**, 942-956.
- Hsu, S.C., Belmonte, M.F., Harada, J.J., and Inoue, K.** (2010). Indispensable Roles of Plastids in Arabidopsis thaliana Embryogenesis. *Current genomics* **11**, 338-349.
- Inaba, T., and Ito-Inaba, Y.** (2010). Versatile roles of plastids in plant growth and development. *Plant & cell physiology* **51**, 1847-1853.
- Ingelsson, B., and Vener, A.V.** (2012). Phosphoproteomics of Arabidopsis chloroplasts reveals involvement of the STN7 kinase in phosphorylation of nucleoid protein pTAC16. *FEBS letters* **586**, 1265-1271.
- Isemer, R., Mulisch, M., Schafer, A., Kirchner, S., Koop, H.U., and Krupinska, K.** (2012). Recombinant Whirly1 translocates from transplastomic chloroplasts to the nucleus. *FEBS letters* **586**, 85-88.
- Ishizaki, Y., Tsunoyama, Y., Hatano, K., Ando, K., Kato, K., Shinmyo, A., Kobori, M., Takeba, G., Nakahira, Y., and Shiina, T.** (2005). A nuclear-encoded sigma factor, Arabidopsis SIG6, recognizes sigma-70 type chloroplast promoters and regulates early chloroplast development in cotyledons. *The Plant journal : for cell and molecular biology* **42**, 133-144.
- Kakizaki, T., Matsumura, H., Nakayama, K., Che, F.S., Terauchi, R., and Inaba, T.** (2009). Coordination of plastid protein import and nuclear gene expression by plastid-to-nucleus retrograde signaling. *Plant physiology* **151**, 1339-1353.
- Kanamaru, K., Nagashima, A., Fujiwara, M., Shimada, H., Shirano, Y., Nakabayashi, K., Shibata, D., Tanaka, K., and Takahashi, H.** (2001). An Arabidopsis sigma factor (SIG2)-dependent expression of plastid-encoded tRNAs in chloroplasts. *Plant & cell physiology* **42**, 1034-1043.
- Kim, N., and Jinks-Robertson, S.** (2012). Transcription as a source of genome instability. *Nature reviews. Genetics* **13**, 204-214.
- Koniger, M., Delamaide, J.A., Marlow, E.D., and Harris, G.C.** (2008). Arabidopsis thaliana leaves with altered chloroplast numbers and chloroplast movement exhibit

- impaired adjustments to both low and high light. *Journal of experimental botany* **59**, 2285-2297.
- Koussevitzky, S., Nott, A., Mockler, T.C., Hong, F., Sachetto-Martins, G., Surpin, M., Lim, J., Mittler, R., and Chory, J.** (2007). Signals from chloroplasts converge to regulate nuclear gene expression. *Science* **316**, 715-719.
- Krause, K., Maier, R.M., Kofer, W., Krupinska, K., and Herrmann, R.G.** (2000). Disruption of plastid-encoded RNA polymerase genes in tobacco: expression of only a distinct set of genes is not based on selective transcription of the plastid chromosome. *Molecular and General Genetics MGG* **263**, 1022-1030.
- Krause, K., Kilbiński, I., Mulisch, M., Rodiger, A., Schafer, A., and Krupinska, K.** (2005). DNA-binding proteins of the Whirly family in *Arabidopsis thaliana* are targeted to the organelles. *FEBS letters* **579**, 3707-3712.
- Kuhn, K., Bohne, A.V., Liere, K., Weihe, A., and Börner, T.** (2007). *Arabidopsis* phage-type RNA polymerases: accurate in vitro transcription of organellar genes. *The Plant cell* **19**, 959-971.
- Larkin, R.M., Alonso, J.M., Ecker, J.R., and Chory, J.** (2003). GUN4, a regulator of chlorophyll synthesis and intracellular signaling. *Science* **299**, 902-906.
- Lee, K.P., Kim, C., Landgraf, F., and Apel, K.** (2007). EXECUTER1- and EXECUTER2-dependent transfer of stress-related signals from the plastid to the nucleus of *Arabidopsis thaliana*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **104**, 10270-10275.
- Legen, J., Kemp, S., Krause, K., Profanter, B., Herrmann, R.G., and Maier, R.M.** (2002). Comparative analysis of plastid transcription profiles of entire plastid chromosomes from tobacco attributed to wild-type and PEP-deficient transcription machineries. *The Plant journal : for cell and molecular biology* **31**, 171-188.
- Leon, P., Arroyo, A., and Mackenzie, S.** (1998). Nuclear Control of Plastid and Mitochondrial Development in Higher Plants. *Annual review of plant physiology and plant molecular biology* **49**, 453-480.
- Liere, K., and Maliga, P.** (1999). In vitro characterization of the tobacco *rpoB* promoter reveals a core sequence motif conserved between phage-type plastid and plant mitochondrial promoters. *The EMBO journal* **18**, 249-257.
- Liere, K., and Börner, T.** (2007). Transcription and transcriptional regulation in plastids. In *Cell and Molecular Biology of Plastids*, R. Bock, ed (Springer Berlin / Heidelberg), pp. 121-174.
- Liere, K., Weihe, A., and Börner, T.** (2011). The transcription machineries of plant mitochondria and chloroplasts: Composition, function, and regulation. *Journal of plant physiology* **168**, 1345-1360.
- Ling, Q., Huang, W., Baldwin, A., and Jarvis, P.** (2012). Chloroplast biogenesis is regulated by direct action of the ubiquitin-proteasome system. *Science* **338**, 655-659.
- Loschelder, H., Schweer, J., Link, B., and Link, G.** (2006). Dual temporal role of plastid sigma factor 6 in *Arabidopsis* development. *Plant physiology* **142**, 642-650.
- Lysenko, E.A.** (2007). Plant sigma factors and their role in plastid transcription. *Plant cell reports* **26**, 845-859.



- Maréchal, A., Parent, J.S., Veronneau-Lafortune, F., Joyeux, A., Lang, B.F., and Brisson, N.** (2009). Whirly proteins maintain plastid genome stability in Arabidopsis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **106**, 14693-14698.
- Martin, W.** (2003). Gene transfer from organelles to the nucleus: frequent and in big chunks. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **100**, 8612-8614.
- Martin, W., and Herrmann, R.G.** (1998). Gene transfer from organelles to the nucleus: how much, what happens, and Why? *Plant physiology* **118**, 9-17.
- Martin, W., and Kowallik, K.** (1999). Annotated English translation of Mereschowsky's 1905 paper 'Über Natur und Ursprung der Chromatophoren im Pflanzenreiche'. *European Journal of Phycology* **34**, 287-295.
- Maruta, T., Tanouchi, A., Tamoi, M., Yabuta, Y., Yoshimura, K., Ishikawa, T., and Shigeoka, S.** (2010). Arabidopsis chloroplastic ascorbate peroxidase isoenzymes play a dual role in photoprotection and gene regulation under photooxidative stress. *Plant & cell physiology* **51**, 190-200.
- Meskauskiene, R., Wursch, M., Laloi, C., Vidi, P.A., Coll, N.S., Kessler, F., Baruah, A., Kim, C., and Apel, K.** (2009). A mutation in the Arabidopsis mTERF-related plastid protein SOLDAT10 activates retrograde signaling and suppresses (1)O(2)-induced cell death. *The Plant journal : for cell and molecular biology* **60**, 399-410.
- Nagashima, A., Hanaoka, M., Shikanai, T., Fujiwara, M., Kanamaru, K., Takahashi, H., and Tanaka, K.** (2004). The multiple-stress responsive plastid sigma factor, SIG5, directs activation of the psbD blue light-responsive promoter (BLRP) in Arabidopsis thaliana. *Plant & cell physiology* **45**, 357-368.
- Nott, A., Jung, H.S., Koussevitzky, S., and Chory, J.** (2006). Plastid-to-nucleus retrograde signaling. *Annual review of plant biology* **57**, 739-759.
- op den Camp, R.G., Przybyla, D., Ochsenbein, C., Laloi, C., Kim, C., Danon, A., Wagner, D., Hideg, E., Gobel, C., Feussner, I., Nater, M., and Apel, K.** (2003). Rapid induction of distinct stress responses after the release of singlet oxygen in Arabidopsis. *The Plant cell* **15**, 2320-2332.
- Parent, J.S., Lepage, E., and Brisson, N.** (2011). Divergent roles for the two PolI-like organelle DNA polymerases of Arabidopsis. *Plant physiology* **156**, 254-262.
- Pesaresi, P., Hertle, A., Pribil, M., Schneider, A., Kleine, T., and Leister, D.** (2010). Optimizing photosynthesis under fluctuating light: The role of the Arabidopsis STN7 kinase. *Plant signaling & behavior* **5**.
- Pesaresi, P., Hertle, A., Pribil, M., Kleine, T., Wagner, R., Strissel, H., Ihnatowicz, A., Bonardi, V., Scharfenberg, M., Schneider, A., Pfannschmidt, T., and Leister, D.** (2009). Arabidopsis STN7 kinase provides a link between short- and long-term photosynthetic acclimation. *The Plant cell* **21**, 2402-2423.
- Pfalz, J., Liere, K., Kandlbinder, A., Dietz, K.J., and Oelmüller, R.** (2006). pTAC2, -6, and -12 are components of the transcriptionally active plastid chromosome that are required for plastid gene expression. *The Plant cell* **18**, 176-197.

- Pfannschmidt, T., and Link, G.** (1994). Separation of two classes of plastid DNA-dependent RNA polymerases that are differentially expressed in mustard (*Sinapis alba* L.) seedlings. *Plant Molecular Biology* **25**, 69-81.
- Pfannschmidt, T., and Link, G.** (1997). The A and B forms of plastid DNA-dependent RNA polymerase from mustard (*Sinapis alba* L.) transcribe the same genes in a different developmental context. *Molecular & general genetics : MGG* **257**, 35-44.
- Pogson, B.J., and Albrecht, V.** (2011). Genetic dissection of chloroplast biogenesis and development: an overview. *Plant physiology* **155**, 1545-1551.
- Pontier, D., Albrieux, C., Joyard, J., Lagrange, T., and Block, M.A.** (2007). Knock-out of the magnesium protoporphyrin IX methyltransferase gene in *Arabidopsis*. Effects on chloroplast development and on chloroplast-to-nucleus signaling. *The Journal of biological chemistry* **282**, 2297-2304.
- Porra, R.J., Thompson, W.A., and Kriedemann, P.E.** (1989). Determination of accurate extinction coefficients and simultaneous equations for assaying chlorophylls a and b extracted with four different solvents: verification of the concentration of chlorophyll standards by atomic absorption spectroscopy. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* **975**, 384-394.
- Prikryl, J., Watkins, K.P., Friso, G., van Wijk, K.J., and Barkan, A.** (2008). A member of the Whirly family is a multifunctional RNA- and DNA-binding protein that is essential for chloroplast biogenesis. *Nucleic acids research* **36**, 5152-5165.
- Privat, I., Hakimi, M.A., Buhot, L., Favory, J.J., and Mache-Lerbs, S.** (2003). Characterization of *Arabidopsis* plastid sigma-like transcription factors SIG1, SIG2 and SIG3. *Plant Mol Biol* **51**, 385-399.
- Puthiyaveetil, S., Ibrahim, I.M., Jelacic, B., Tomasic, A., Fulgosi, H., and Allen, J.F.** (2010). Transcriptional control of photosynthesis genes: the evolutionarily conserved regulatory mechanism in plastid genome function. *Genome biology and evolution* **2**, 888-896.
- Puthiyaveetil, S., Kavanagh, T.A., Cain, P., Sullivan, J.A., Newell, C.A., Gray, J.C., Robinson, C., van der Giezen, M., Rogers, M.B., and Allen, J.F.** (2008). The ancestral symbiont sensor kinase CSK links photosynthesis with gene expression in chloroplasts. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **105**, 10061-10066.
- Pyke, K.A., Marrison, J.L., and Leech, A.M.** (1991). Temporal and Spatial Development of the Cells of the Expanding First Leaf of *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. *Journal of experimental botany* **42**, 1407-1416.
- Rapp, J.C., and Mullet, J.E.** (1991). Chloroplast transcription is required to express the nuclear genes *rbcS* and *cab*. Plastid DNA copy number is regulated independently. *Plant Molecular Biology* **17**, 813-823.
- Richard, D.J., Bell, S.D., and White, M.F.** (2004). Physical and functional interaction of the archaeal single-stranded DNA-binding protein SSB with RNA polymerase. *Nucleic acids research* **32**, 1065-1074.
- Sakai, A., Saito, C., Inada, N., and Kuroiwa, T.** (1998). Transcriptional activities of the chloroplast-nuclei and proplastid-nuclei isolated from tobacco exhibit different

- sensitivities to tagetitoxin: implication of the presence of distinct RNA polymerases. *Plant & cell physiology* **39**, 928-934.
- Schweer, J., Loschelder, H., and Link, G.** (2006). A promoter switch that can rescue a plant sigma factor mutant. *FEBS letters* **580**, 6617-6622.
- Schweer, J., Geimer, S., Meurer, J., and Link, G.** (2009). Arabidopsis mutants carrying chimeric sigma factor genes reveal regulatory determinants for plastid gene expression. *Plant & cell physiology* **50**, 1382-1386.
- Schweer, J., Turkeri, H., Kolpack, A., and Link, G.** (2010a). Role and regulation of plastid sigma factors and their functional interactors during chloroplast transcription - recent lessons from Arabidopsis thaliana. *European journal of cell biology* **89**, 940-946.
- Schweer, J., Turkeri, H., Link, B., and Link, G.** (2010b). AtSIG6, a plastid sigma factor from Arabidopsis, reveals functional impact of cpCK2 phosphorylation. *The Plant journal : for cell and molecular biology* **62**, 192-202.
- Severinov, K., Mustaev, A., Kukarin, A., Muzzin, O., Bass, I., Darst, S.A., and Goldfarb, A.** (1996). Structural Modules of the Large Subunits of RNA Polymerase: INTRODUCING ARCHAEABACTERIAL AND CHLOROPLAST SPLIT SITES IN THE  $\beta$  AND  $\beta'$  SUBUNITS OF ESCHERICHIA COLI RNA POLYMERASE. *Journal of Biological Chemistry* **271**, 27969-27974.
- Shimizu, M., Kato, H., Ogawa, T., Kurachi, A., Nakagawa, Y., and Kobayashi, H.** (2010). Sigma factor phosphorylation in the photosynthetic control of photosystem stoichiometry. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **107**, 10760-10764.
- Steiner, S., Schroter, Y., Pfalz, J., and Pfannschmidt, T.** (2011). Identification of essential subunits in the plastid-encoded RNA polymerase complex reveals building blocks for proper plastid development. *Plant physiology* **157**, 1043-1055.
- Strand, A., Asami, T., Alonso, J., Ecker, J.R., and Chory, J.** (2003). Chloroplast to nucleus communication triggered by accumulation of Mg-protoporphyrinIX. *Nature* **421**, 79-83.
- Sullivan, J.A., and Gray, J.C.** (1999). Plastid Translation Is Required for the Expression of Nuclear Photosynthesis Genes in the Dark and in Roots of the Pea *lip1* Mutant. *The Plant cell* **11**, 901-910.
- Sun, X., Feng, P., Xu, X., Guo, H., Ma, J., Chi, W., Lin, R., Lu, C., and Zhang, L.** (2011). A chloroplast envelope-bound PHD transcription factor mediates chloroplast signals to the nucleus. *Nature communications* **2**, 477.
- Susek, R.E., Ausubel, F.M., and Chory, J.** (1993). Signal transduction mutants of Arabidopsis uncouple nuclear CAB and RBCS gene expression from chloroplast development. *Cell* **74**, 787-799.
- Suzuki, J.Y., Ytterberg, A.J., Beardslee, T.A., Allison, L.A., Wijk, K.J., and Maliga, P.** (2004). Affinity purification of the tobacco plastid RNA polymerase and in vitro reconstitution of the holoenzyme. *The Plant journal : for cell and molecular biology* **40**, 164-172.

- Swiatecka-Hagenbruch, M., Emanuel, C., Hedtke, B., Liere, K., and Borner, T.** (2008). Impaired function of the phage-type RNA polymerase RpoTp in transcription of chloroplast genes is compensated by a second phage-type RNA polymerase. *Nucleic acids research* **36**, 785-792.
- Tozawa, Y., Teraishi, M., Sasaki, T., Sonoike, K., Nishiyama, Y., Itaya, M., Miyao, A., and Hirochika, H.** (2007). The plastid sigma factor SIG1 maintains photosystem I activity via regulated expression of the *psaA* operon in rice chloroplasts. *The Plant journal : for cell and molecular biology* **52**, 124-132.
- Wagner, D., Przybyla, D., Op den Camp, R., Kim, C., Landgraf, F., Lee, K.P., Wursch, M., Laloi, C., Nater, M., Hideg, E., and Apel, K.** (2004). The genetic basis of singlet oxygen-induced stress responses of *Arabidopsis thaliana*. *Science* **306**, 1183-1185.
- Wall, M.K., Mitchenall, L.A., and Maxwell, A.** (2004). *Arabidopsis thaliana* DNA gyrase is targeted to chloroplasts and mitochondria. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **101**, 7821-7826.
- Weigel, D., and Glazebrook, J.** (2002). *Arabidopsis: A Laboratory Manual*. (Cold Spring Harbor Laboratory Press).
- Wise, R.R.** (2006). The Diversity of Plastid Form and Function. In *The Structure and Function of Plastids*, R.R. Wise and J.K. Hooper, eds (Springer Netherlands), pp. 3-26.
- Woodson, J.D., Perez-Ruiz, J.M., Schmitz, R.J., Ecker, J.R., and Chory, J.** (2012). Sigma factor mediated plastid retrograde signals control nuclear gene expression. *The Plant journal : for cell and molecular biology*.
- Xie, Y.D., Li, W., Guo, D., Dong, J., Zhang, Q., Fu, Y., Ren, D., Peng, M., and Xia, Y.** (2010). The *Arabidopsis* gene SIGMA FACTOR-BINDING PROTEIN 1 plays a role in the salicylate- and jasmonate-mediated defence responses. *Plant, cell & environment* **33**, 828-839.
- Yagi, Y., Ishizaki, Y., Nakahira, Y., Tozawa, Y., and Shiina, T.** (2012). Eukaryotic-type plastid nucleoid protein pTAC3 is essential for transcription by the bacterial-type plastid RNA polymerase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **109**, 7541-7546.
- Yao, J., Roy-Chowdhury, S., and Allison, L.A.** (2003). AtSig5 is an essential nucleus-encoded *Arabidopsis* sigma-like factor. *Plant physiology* **132**, 739-747.
- Yu, Q.B., Lu, Y., Ma, Q., Zhao, T.T., Huang, C., Zhao, H.F., Zhang, X.L., Lv, R.H., and Yang, Z.N.** (2012). TAC7, an essential component of the plastid transcriptionally active chromosome complex, interacts with FLN1, TAC10, TAC12 and TAC14 to regulate chloroplast gene expression in *Arabidopsis thaliana*. *Physiologia plantarum*.
- Zghidi, W., Merendino, L., Cottet, A., Mache, R., and Lerbs-Mache, S.** (2007). Nucleus-encoded plastid sigma factor SIG3 transcribes specifically the *psbN* gene in plastids. *Nucleic acids research* **35**, 455-464.
- Zhang, L., Kato, Y., Otters, S., Vothknecht, U.C., and Sakamoto, W.** (2012). Essential Role of VIPP1 in Chloroplast Envelope Maintenance in *Arabidopsis*. *The Plant cell* **24**, 3695-3707.

- Zhelyazkova, P., Sharma, C.M., Forstner, K.U., Liere, K., Vogel, J., and Borner, T. (2012).** The primary transcriptome of barley chloroplasts: numerous noncoding RNAs and the dominating role of the plastid-encoded RNA polymerase. *The Plant cell* **24**, 123-136.
- Zoschke, R., Liere, K., and Borner, T. (2007).** From seedling to mature plant: arabidopsis plastidial genome copy number, RNA accumulation and transcription are differentially regulated during leaf development. *The Plant journal : for cell and molecular biology* **50**, 710-722.